

ANALYSE FONCTIONNELLE DE PROMOTEURS DANS UN CONTEXTE DE STRESS  
CHEZ LE PEUPLIER

par

Jocelyne Ayotte

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2010



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-65617-4  
*Our file Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-65617-4

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

Le 4 août 2010

*le jury a accepté le mémoire de Madame Jocelyne Ayotte  
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeure Nathalie Beaudoin  
Directrice de recherche  
Département de biologie

Monsieur Armand Séguin  
Codirecteur de recherche  
Ressources naturelles Canada  
Centre de Foresterie des Laurentides

Professeur Kamal Bouarab  
Membre  
Département de biologie

Professeure Carole Beaulieu  
Présidente rapporteure  
Département de biologie

## SOMMAIRE

Le peuplier demeure un système de choix pour l'étude des végétaux, entre autres à cause de son génome relativement petit et entièrement séquencé. Sous nos latitudes, il est l'une des espèces à croissance rapide les plus utilisées dans les plantations d'arbres. La monoculture – comme chez tous les végétaux d'ailleurs – le rend plus sujet aux maladies. Les facteurs de transcription WRKY, présents chez une majorité d'eucaryotes (excepté les mammifères et les levures), sont souvent impliqués dans les mécanismes de défense des végétaux. Plus particulièrement, le facteur WRKY23 du peuplier semble avoir une fonction dans la lutte contre la maladie de la rouille. Les WRKY se lient aux boîtes W situées dans les séquences promotrices des gènes qu'ils régulent. Il semble que les séquences promotrices des gènes reliés à la défense ont un enrichissement de boîtes W, comparativement à un ensemble de séquences promotrices choisies au hasard. Un groupe de séquences promotrices dont les gènes sont dérégulés dans des plants de peuplier surexprimant *PtWRKY23* a été sélectionné pour cette étude; ces séquences ont été choisies car leurs gènes sont potentiellement régulés par *PtWRKY23*. Ici, les séquences promotrices de gènes dérégulés dans des peupliers surexprimeurs de *PtWRKY23* ne contiennent pas plus de boîtes W qu'un groupe de promoteurs sur lequel la surexpression de *PtWRKY23* ne semble pas avoir d'effet. De plus, l'emplacement des boîtes W ne semble pas conservé entre les séquences promotrices du peuplier et celles de la plante modèle *Arabidopsis*. Un système de transformation transitoire sur cellules de peuplier en suspension a été mis au point pour permettre l'étude d'interactions directes et indirectes entre *PtWRKY23* et des séquences promotrices de gènes impliqués dans la défense. D'ailleurs, l'ajout de l'exogène *PtWRKY23* sous la gouverne d'un promoteur constitutif augmente la production du produit du gène rapporteur *GUS* sous le contrôle de la séquence promotrice d'une chalcone synthase, *CHS3*. Voilà une première interaction potentielle avec *PtWRKY23*, qui pourrait éclaircir le rôle de *PtWRKY23* dans les réactions de défense.

## REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu être complété sans l'aide de plusieurs personnes, et j'aimerais remercier ici ces précieuses ressources.

Je lance les premières fleurs au Dr Armand Séguin. Armand a toujours été disponible pour discuter de mon projet, éclairer ma lanterne et ajouter de l'eau au moulin en apportant toujours des idées nouvelles. Merci également au Dr Nathalie Beaudoin de sa grande disponibilité et de sa sagesse. Merci aux conseillers Dr Carole Beaulieu et Dr Kamal Bouarab de m'avoir suivie tout au long de cette odyssée qu'est la maîtrise.

Merci à la belle et grande équipe de biologistes: Marie-Josée Morency, Gervais Pelletier, Caroline Levasseur, Denis Lachance, Françoise Pelletier et Don Stewart. Merci d'avoir partagé votre temps et votre expérience, sans vous, je n'aurais pas pu avancer ce travail.

Chers collègues: Marie-Claude Nicole, Meriem Benchabane, Isabelle Duval, An Nyugen, Hugo Germain, Ian Major, Louis-Philippe Hamel, Frédéric Vigneault, Laurent Lamalice, Valérie Levée et Aïda Azaeiz, ce fut un plaisir de vous côtoyer au quotidien. Merci d'avoir participé à la résolution de problèmes en discutant avec moi de mon projet.

Merci à ma famille et à mes amis qui se sont demandés où j'étais passée ces dernières années, mais qui ont pris leur mal en patience et qui ont attendu que je ressurgisse ! Un merci tout spécial à Jessie pour son amitié inestimable. Merci à mon amoureux Joseph pour son soutien et sa douceur, merci d'être présent pour apaiser les petites et grandes angoisses.

C'est l'accumulation de toutes vos contributions qui ont permis l'aboutissement de ce projet. Merci à vous tous.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
REMERCIEMENTS .....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	viii
LISTE DES TABLEAUX .....	xi
LISTE DES FIGURES .....	xii
INTRODUCTION .....	1
A - PRÉAMBULE.....	1
B – MÉCANISMES DE DÉFENSE DES VÉGÉTAUX.....	2
B.1 Stress biotiques et abiotiques .....	2
B.1.1. Mycètes .....	3
B.2 Défenses constitutives et défenses induites .....	3
B.3 Système immunitaire végétal.....	4
B.4 Résistance .....	10
B.6 Signalisation.....	12
B.7 Hormones végétales impliquées dans la défense .....	13
C – LE PEUPLIER COMME SYSTÈME MODÈLE .....	15
D – RÔLES DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION.....	16
D.1 Généralités .....	16
D.2 Régulation de la transcription par les protéines WRKY .....	17
D.3 WRKY23 .....	21
E – EXPRESSION TRANSITOIRE PAR <i>AGROBACTERIUM</i> .....	22
E.1. Mécanisme .....	23
E.2 Vecteurs binaires .....	25
E.3 Transformation stable et transitoire .....	25

E.4 Avantages de l'utilisation de l'agrobactérie.....	26
E.5 Avantages d'un système de cellules en suspension .....	27
E.6 Réponses de défense engendrées par l' <i>Agrobacterium</i> .....	28
F - HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....	28
F.1. Problématique.....	28
F.2. Hypothèses .....	29
F.3. Objectifs .....	29
CHAPITRE 1.....	31
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	31
1.1 COMPTAGE DES BOÎTES W .....	31
1.2 COMPARAISON AVEC ARABIDOPSIS .....	32
1.3 CULTURE CELLULAIRE .....	33
1.4 CLONAGE DES PROMOTEURS ET DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION.....	33
1.5 TRANSFORMATION TRANSITOIRE PAR L' <i>AGROBACTERIUM</i> .....	34
1.5.1 Co-culture .....	34
1.5.2 Révélation GUS .....	36
1.6 PCR QUANTITATIF EN TEMPS REEL RTqPCR .....	36
1.6.1 Préparation des échantillons .....	36
1.6.2 Construction des amorces .....	37
1.6.3 Paramètres du RTqPCR.....	37
1.6.4 Normalisation et analyse des données .....	39
CHAPITRE 2.....	40
RÉSULTATS .....	40
2.1 ANALYSE DES BOITES W DANS LES PROMOTEURS DES GENES DEREGLÉS DANS LES PLANTS TRANSGENIQUES SUREXPRIMANT WRKY23.....	40
2.2 DISPOSITION DES BOITES W DANS LES PROMOTEURS CHOISIS CHEZ LES ORTHOLOGUES D'ARABIDOPSIS .....	41
2.3 ANALYSE FONCTIONNELLE DES PROMOTEURS PAR EXPRESSION TRANSITOIRE DANS DES CELLULES DE PEUPLIER .....	46

2.4 ÉTUDE DE L'ACCUMULATION DE TRANSCRITS POUR LES GENES CANDIDATS CHOISIS .....	47
2.4 ESSAIS DE CO-TRANSFORMATION AVEC LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION WRKY23 .....	56
CHAPITRE 3.....	62
DISCUSSION.....	62
3.1 LES GENES REGULES PAR PTWRKY23 N'ONT PAS NECESSAIREMENT DANS LEURS SEQUENCES PROMOTRICES UN NOMBRE ELEVE DE BOITES W .....	62
3.2 IMPACT DE LA STRUCTURE DU PROMOTEUR PAR RAPPORT AU NOMBRE ABSOLU DE BOITES W .....	62
3.3 ANALYSE <i>IN SILICO</i> ET AGRO-INFECTION TRANSITOIRE: DES OUTILS EFFICACES POUR L'ETUDE DE PROMOTEURS .....	63
3.4 EST-CE QUE PTWRKY23 POURRAIT AVOIR BESOIN DE PARTENAIRES POUR REEMPLIR SON ROLE?.....	65
CONCLUSION .....	66
BIBLIOGRAPHIE .....	68



## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AC : Acide cinnamique  
ACC : Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ADN-T : ADN transféré  
AJ : Acide jasmonique  
AS : Acide salicylique  
*At* : *Arabidopsis thaliana*  
Avr : Protéine d'avirulence  
CC : Domaine coiled-coil  
CDC : Protéine kinase cycline-dépendante  
CHS : Chalcone synthase  
DAMP : Patron moléculaire associé aux dommages  
DO : Densité optique  
EIF : Facteur d'initiation de la transcription eucaryote  
ET : Éthylène  
ETI : Immunité conduite par les effecteurs  
ETS : Susceptibilité conduite par les effecteurs  
FAO : Forme active d'oxygène  
g : Gramme  
GST : Glutathion-S-transférase  
GUS :  $\beta$ -glucuronidase  
HR : Réponse hypersensible  
kb : Kilobase  
L : Litre

LRR : Région riche en leucine  
 MAMP : Patron moléculaire associé aux microbes  
 MAPK : Mitogen activated protein kinase  
 mg : Milligramme  
 min : Minute  
 mL : Millilitre  
*Mmd* : *Melampsora medusae* s.sp. *deltoidae*  
*Mmt* : *Melampsora medusae* s.sp. *tremuloidae*  
 NADPH : Nicotiamide adénine dinucléotide phosphate  
 NB : Site de liaison nucléaire  
 ng : Nanogramme  
 NO : Oxyde nitrique  
 PAL : Phénylalanine ammonia-lyase  
 PAMP : Patron moléculaire associé aux agents pathogènes  
 pb : Paire de bases  
 PCR : Réaction de polymérisation en chaîne  
 PPO : Polyphénol oxydase  
 PR : Protéine reliée à la pathogenèse  
 PRR : Récepteur de reconnaissance de patrons  
 Pt : *Populus trichocarpa*  
 PTI : Immunité conduite par les PAMP  
 R : Gène de résistance  
 RLK : Protéine kinase de type récepteur  
 rpm : Rotation par minute  
 RTqPCR : PCR quantitatif en temps réel  
 s : Seconde  
 SAR : Résistance systémique acquise  
 SOD : Superoxyde dismutase  
 STZ : Protéine à doigt de zinc impliquée dans la tolérance au sel  
 Ti : Plasmide induisant la tumeur

TI : Inhibiteur de trypsine de la famille des Kunitz

TIR : Récepteur Toll-interleukin-1

UBI : Ubiquitine

UTR : Région non traduite

$\mu\text{g}$  : Microgramme

$\mu\text{L}$  : Microlitre

$\mu\text{M}$  : Micromolaire

*vir* : Gènes d'induction de tumeur

VSP : Protéine végétative de rangement

ZFP : Protéine à doigt de zinc

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Noms complets des gènes étudiés, avec gène modèle, identifiant de protéine et orthologue putatif d'Arabidopsis correspondants .....	32
Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour le clonage des séquences promotrices des gènes suivants, à partir d'ADN génomique de <i>P. trichocarpa</i> . ....	35
Tableau 3. Amorces utilisées pour la quantification des endogènes par qPCR. ....	38
Tableau 4. Amorces des gènes reliés au cycle cellulaire ( <i>house-keeping</i> ) utilisés comme témoins internes lors de la quantification des endogènes par qPCR. ....	39
Tableau 5. Moyennes du nombre de boîtes W dans les séquences promotrices des gènes dérégulés dans les plants de peuplier surexprimant <i>WRKY23</i> . ....	41

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Modèle expliquant les deux branches de l'immunité chez les plantes, l'immunité conduite par les PAMP et l'immunité conduite par les effecteurs. ....	7
Figure 2. Modèle en zig-zag réunissant en divers épisodes consécutifs les deux branches du système immunitaire végétal (immunité basale et résistance gène pour gène) en ajoutant une dimension par des gradients de défense et de pathogénicité. ....	9
Figure 3. Résistance systémique chez un plant de peuplier. ....	11
Figure 4. Aperçu des voies de signalisation impliquées dans les réponses de défense. ....	14
Figure 5. Modèle hypothétique selon lequel les facteurs de transcription WRKY seraient constitutivement liés au promoteur. ....	19
Figure 6. Transformation par <i>Agrobacterium</i> , du phénomène naturel à l'utilisation en laboratoire.....	24
Figure 7. Disposition des boîtes W sur une sélection de séquences promotrices de 2000 paires de bases (pb). ....	46
Figure 8. Cellules de peuplier infectées par l' <i>Agrobacterium</i> contenant un vecteur <i>promoteur::GUS</i> , incubées dans une solution de x-glucuronide.....	48
Figure 9. Différences d'expression de gènes de défense entre les cellules infectées par l' <i>Agrobacterium</i> et celles témoin, par rapport au jour zéro.....	52
Figure 10. Nombre de transcrits pour chaque endogène étudié, chez un système infecté par l' <i>Agrobacterium</i> et un système sans infection.....	54
Figure 11. Co-transformation de cellules de peuplier par deux types d' <i>Agrobacterium</i> , l'un contenant un vecteur <i>promoteur::GUS</i> , l'autre la séquence codant pour WRKY23 ou un vecteur vide comme témoin négatif. ....	58
Figure 12. Cellules de peuplier infectées par l' <i>Agrobacterium</i> contenant un vecteur <i>CHS3::GUS</i> et un autre contenant le gène <i>WRKY23</i> ou un vecteur vide. ....	59

Figure 13. Cellules de peuplier infectées par l' <i>Agrobacterium</i> contenant un vecteur <i>hevein::GUS</i> et un autre contenant le gène <i>WRKY23</i> ou un vecteur vide. ....	60
Figure 14. Cellules de peuplier infectées par l' <i>Agrobacterium</i> contenant un vecteur <i>VSP::GUS</i> et un autre contenant le gène <i>WRKY23</i> ou un vecteur vide. ....	61

# INTRODUCTION

## A - PRÉAMBULE

L'agriculteur, le forestier, le botaniste, bref, toute personne qui travaille de près ou de loin avec les végétaux a le souci d'éviter et de contrôler les maladies potentielles. Pourtant, la majeure partie des assauts des agents pathogènes passe inaperçue à nos yeux parce que la plante empêche la propagation avant qu'elle ne soit visible. Les végétaux possèdent un arsenal raffiné de réponses de défense, sonnant l'alerte dans les régions avoisinantes à celles infectées, restreignant l'envahissement de l'ennemi en produisant des composés de protection qui viennent renforcer les parois cellulaires, et neutralisant l'agent pathogène en déversant une panoplie de composés toxiques, tout en tentant de limiter l'autodestruction en ayant des boucles de régulation.

Les facteurs de transcription de la famille WRKY permettent le déclenchement et la modulation de réponses de défense. Au laboratoire, la caractérisation fonctionnelle du gène de peuplier *WRKY23*, qui est l'orthologue de *WRKY23* de l'*Arabidopsis*, a été publiée (Levée *et al.*, 2009). Ce gène a été isolé d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) créée à partir de feuilles de peuplier stressées par l'ajout d'acide jasmonique (AJ), d'acide salicylique (AS) ou de chitosane (fraction de la paroi des mycètes). Près de 600 gènes sont dérégulés dans les plants de peuplier transgéniques surexprimant le gène *PtWRKY23*, impliqués entre autres dans la biosynthèse des parois et dans la réponse aux stress. La moitié de ces gènes dérégulés sont également impliqués dans la réponse de défense face à la rouille du peuplier, maladie causée par le champignon *Melampsora medusae*. L'expression de *PtWRKY23* est induite rapidement après une infection avec *M. medusae*, une blessure ou un traitement avec des éliciteurs

généraux. La surexpression de *PtWRKY23* dans des peupliers transgéniques altère l'accumulation de lignine, les niveaux d'activité de la peroxydase et l'accumulation d' $H_2O_2$ . En se basant sur ces observations, nous supposons donc que *PtWRKY23* agit comme modulateur de certaines réponses de défense.

L'origine du projet décrit ici découle de ces premiers travaux sur *PtWRKY23*. Nous avons effectué une sélection de promoteurs dont les gènes sont impliqués dans les réponses de stress, afin d'en faire une analyse fonctionnelle *in silico* et *in vivo*. Pour faire une liste de promoteurs à étudier, nous avons donc un a priori pour la sélection de certains d'entre eux (i.e. gènes de défense dérégulés par la surexpression de *PtWRKY23*), et d'autres promoteurs ont été sélectionnés sans a priori (i.e. gènes de défense en général). Par exemple, le gène codant pour la protéine végétative d'entreposage *VSP pni288* a un niveau d'expression de 21,3 fois plus élevé dans les plants transgéniques surexprimant *PtWRKY23*, comparativement à des plants sauvages (Levée *et al.*, 2009). Le gène de la kinase *PtMAPK3-1* a plutôt été utilisé comme marqueur de la réponse de défense à cause de son induction rapide et élevée suite à un stress. La liste de promoteurs de gènes choisis et sa justification se retrouvent plus loin dans l'introduction.

## **B – MÉCANISMES DE DÉFENSE DES VÉGÉTAUX**

### **B.1 Stress biotiques et abiotiques**

Les plantes sont confrontées à deux types majeurs de stress. Les stress abiotiques sont causés par les éléments inertes liés à l'environnement, tels la température, les rayons ultraviolets, la disponibilité de l'eau et sa concentration en sels. Virus, bactéries, champignons, insectes et autres herbivores peuvent provoquer des stress biotiques. Les deux types de stress déclenchent



chez les plantes des mécanismes de défense. La blessure se situe à cheval entre les deux catégories, car elle peut être causée par un herbivore (stress mécanique), ou due à l'environnement (vent, par exemple). Le stress causé par blessure induit certaines des réponses de défense engendrées par les stress biotiques et abiotiques (Ma et Bohnert, 2007).

### **B.1.1. Mycètes**

Il existe deux types majeurs de mycètes: les biotrophes, qui ne vivent que sur du matériel vivant, et les nécrotrophes, qui se nourrissent à partir de tissus nécrosés. Les hémibiotrophes sont soit biotrophes, soit nécrotrophes, mais à des phases différentes de leur cycle de vie.

## **B.2 Défenses constitutives et défenses induites**

Pour contrer une panoplie d'agents pathogènes, les plantes ont des mécanismes composés de plusieurs niveaux de défense. Les défenses préformées structurales servent de barrière aux microorganismes pathogènes. La paroi cellulaire, la cuticule, le mucilage, les épines, les trichomes et les cires en sont de bons exemples. Pour réussir à pénétrer dans les cellules végétales, le microorganisme pathogène doit avoir des enzymes telles que les cutinases et cellulases, ou alors profiter d'une blessure de la plante.

L'agent pathogène ayant réussi à ébrécher les défenses constitutives déclenche le déploiement des défenses induites. Les phytoanticipines sont des composés antimicrobiens conservés sous forme inactive de manière constitutive (VanEtten *et al.*, 1994). Leurs structures sont modifiées afin de les transformer en produits actifs et toxiques lors de l'attaque de l'agent pathogène. Les phytoalexines, quant à elles, sont des composés antimicrobiens synthétisés *de novo*. Les

protéines reliées à la pathogénèse (PR) sont induites lors d'infections par des champignons, bactéries, virus et insectes. Elles sont divisées en différentes catégories selon leurs propriétés biologiques et biochimiques communes (van Loon *et al.*, 2006b). Par exemple, les PR3, 4, 8 et 11 regroupent des endochitinases, pouvant digérer les parois cellulaires des champignons; le groupe PR6 rassemble des inhibiteurs de protéases, venant bloquer les capacités digestives des nématodes et insectes herbivores. Certaines classes de PR sont retrouvées chez différentes espèces végétales, alors que certaines PR sont spécifiques à une espèce donnée.

Des modifications anatomiques sont apportées au site de pénétration par l'agent pathogène, notamment par la formation de papilles. La synthèse de callose et de lignine viennent renforcer la paroi. D'autres types de défenses induites peuvent être déclenchés, telles les défenses induites indirectes, qui tenteront d'attirer des prédateurs ou des parasites de l'agent pathogène attaquant (Eyles *et al.*, 2010).

### **B.3 Système immunitaire végétal**

Les patrons moléculaires associés aux microbes (MAMP) sont des signatures moléculaires typiques de toutes les classes de microbes, c'est-à-dire que chaque classe de microorganismes a des caractéristiques physiques communes qui elles sont reconnues par la plante. Ils ont une fonction indispensable pour l'organisme en question: la flagelline, sous-unité du flagelle, est essentielle à certains types de bactéries, la chitine, une composante de la paroi cellulaire, est essentielle à plusieurs catégories de mycètes. Anciennement nommés PAMP (patrons moléculaires associés aux pathogènes), les MAMP comprennent aussi des lipopolysaccharides, ergostérols, harpines et peptidoglycanes (Ausubel, 2005). D'un microorganisme à l'autre, les MAMP ont des structures très conservées et ne sont pas présents chez l'hôte, ce qui lui permet de les identifier comme 'non-soi' (Boller et Felix, 2009). Les plantes reconnaissent également les éliciteurs endogènes. Par les enzymes qu'ils produisent,

certains agents pathogènes sont en mesure de lyser les barrières structurales des tissus végétaux pour ensuite infecter la cellule végétale. Les produits générés par ces enzymes peuvent servir d'éliciteurs endogènes ou patrons moléculaires associés aux dommages (DAMP) et sont reconnus de manière similaire aux MAMP (Boller et Felix, 2009). La perception des MAMP et DAMP se fait par des récepteurs de reconnaissance de patrons (PRR) situés à la surface de la cellule végétale. Il y a des centaines de gènes dans les génomes végétaux codant pour les PRR, qui sont divisés en deux catégories: les protéines kinases de type récepteur (RLK) et les protéines de type récepteur (RLP) (He *et al.*, 2007). La reconnaissance d'un MAMP ou d'un DAMP initie une réponse d'immunité innée, appelée immunité conduite par les PAMP (PTI). La signalisation cellulaire se fait par l'activation de cascades de MAPK (mitogen-activated proteins kinases), qui viennent activer des facteurs de transcription, tels ceux de la famille des WRKY, qui à leur tour induisent les gènes reliés à la défense. Il y a alors production de phytoalexines (composés antimicrobiens), de formes actives d'oxygène (FAO) et d'oxyde nitrique, ainsi qu'une déposition de callose sur la paroi comme moyen de la renforcer (He *et al.*, 2007). La PTI met fin à l'envahissement par les agents pathogènes non adaptés.

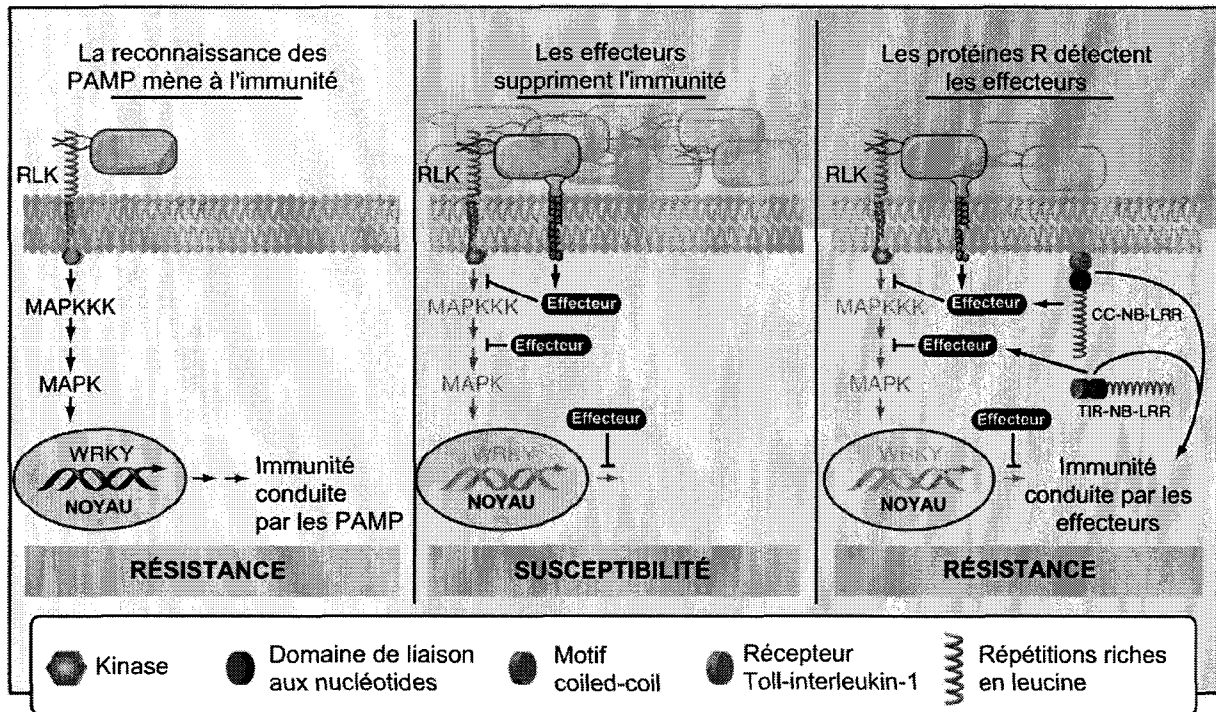
Les agents pathogènes microbiens virulents ont développé des moyens pour traverser cette première ligne d'immunité innée. Par leur système de sécrétion de type III (TTSS), les bactéries pathogènes à Gram négatif envoient directement dans la cellule-hôte des effecteurs qui permettent une plus grande virulence (figure 1). Ce sont des protéines hautement spécifiques qui sont utilisées pour supprimer la PTI. Par exemple, certains effecteurs sont des enzymes qui modifient les protéines de l'hôte et permettent ainsi d'éviter la détection par l'hôte (Chisholm *et al* 2006). Le TTSS – servant de seringue avec laquelle la bactérie peut injecter dans l'eucaryote infecté – est essentiel à la multiplication des bactéries et au développement de la maladie : lorsque qu'il est dysfonctionnel ces bactéries perdent leur pouvoir pathogène et ne peuvent qu'induire la PTI (de Wit, 2007). Du côté des mycètes, les effecteurs peuvent être extracellulaires, sécrétés dans l'apoplaste ou le xylème de leurs hôtes,

ou encore cytoplasmiques, transloqués dans les cellules-hôtes par un mécanisme inconnu à ce jour (de Wit *et al.*, 2009).

Dans la course aux armements, les plantes ont développé à leur tour une seconde ligne de défense: l'immunité conduite par les effecteurs (ETI), aussi connue sous le nom de résistance gène pour gène. L'ETI est basée sur l'interaction hautement spécifique, directe ou indirecte, des effecteurs (protéines d'avirulence Avr) et de leurs récepteurs correspondants qui sont codés par les gènes de résistance (*R*). L'association de la paire effecteur-récepteur assortie déclenche l'initiation de la signalisation de la défense et la résistance de l'hôte. La majorité des gènes *R* codent pour des protéines NB-LRR, définies comme ayant un site de liaison nucléaire (NB) et une région riche en leucine (LRR). En se basant sur le domaine en N-terminal, la classe des NB-LRR peut être divisée en récepteurs coiled-coil (CC) et récepteurs Toll-interleukin-1 (TIR). L'ETI permet l'arrêt de la croissance de l'agent pathogène et mène généralement à une réponse hypersensible (HR) qui est une forme de mort cellulaire programmée au site d'infection (Chisholm *et al.*, 2006). La HR est généralement efficace contre une multitude d'agents pathogènes des végétaux (de Wit, 2007). En l'absence de l'interaction effecteur-récepteur, l'agent pathogène échappe à la détection par l'hôte, et par le fait même infecte la plante.

L'exemple le plus étudié à ce jour reste celui de la détection de la flagelline chez *Arabidopsis* (figure 1). L'équipe de Sheen a identifié la cascade de signalisation par les kinases ainsi que les facteurs de transcription WRKY22/WRKY29 impliqués dans ce phénomène, qui permettent la résistance de la plante (Asai *et al.*, 2002). Le récepteur de la flagelline FLS2, qui est une kinase de type récepteur à répétitions riches en leucine (LRR), une fois lié au peptide de la flagelline flg22, mène à l'activation de cascades de MAPK, qui finalement activeraient les facteurs de transcription (probablement de fonctions redondantes) WRKY22 et WRKY29.

Finalement, la perception des signaux de danger peut donc se faire sous trois formes: par la reconnaissance des MAMP, des DAMP, ou des effecteurs (Boller et Felix, 2009). Les signaux extracellulaires sont perçus par les PRR au niveau de la membrane plasmique alors que les signaux de danger cytoplasmiques se font par les protéines NB-LRR.



**Figure 1. Modèle expliquant les deux branches de l'immunité chez les plantes, l'immunité conduite par les PAMP et l'immunité conduite par les effecteurs.**

Adapté de Chisholm *et al.* (2006). Dans la première fenêtre, la sous-unité du flagelle flg22, est détectée chez Arabidopsis par une kinase de type récepteur (RLK), FLS22, déclenchant une cascade de kinases et amenant une activation des facteurs de transcription WRKY. Les gènes de défense sont alors transcrits et traduits, ce qui donne un état de résistance par la PTI. Dans la seconde fenêtre, la bactérie contourne le système de reconnaissance de l'hôte et promeut sa virulence en utilisant son TTSS pour livrer ses effecteurs directement dans la cellule, rendant ainsi l'hôte susceptible. Dans la troisième fenêtre, les protéines R (CC-NB-LRR et TIR-NB-LRR) détectent les protéines Avr correspondantes ce qui induit une HR, supprime la croissance pathogénique et amène un état de résistance par l'ETI.

Jones et Dangl (2006) ont proposé le modèle en zig-zag, qui permet d'intégrer différentes formes de défense en un seul processus (figure 2). Ce modèle permet de mettre en lien les différentes facettes de la défense et est généralement accepté par la communauté scientifique.

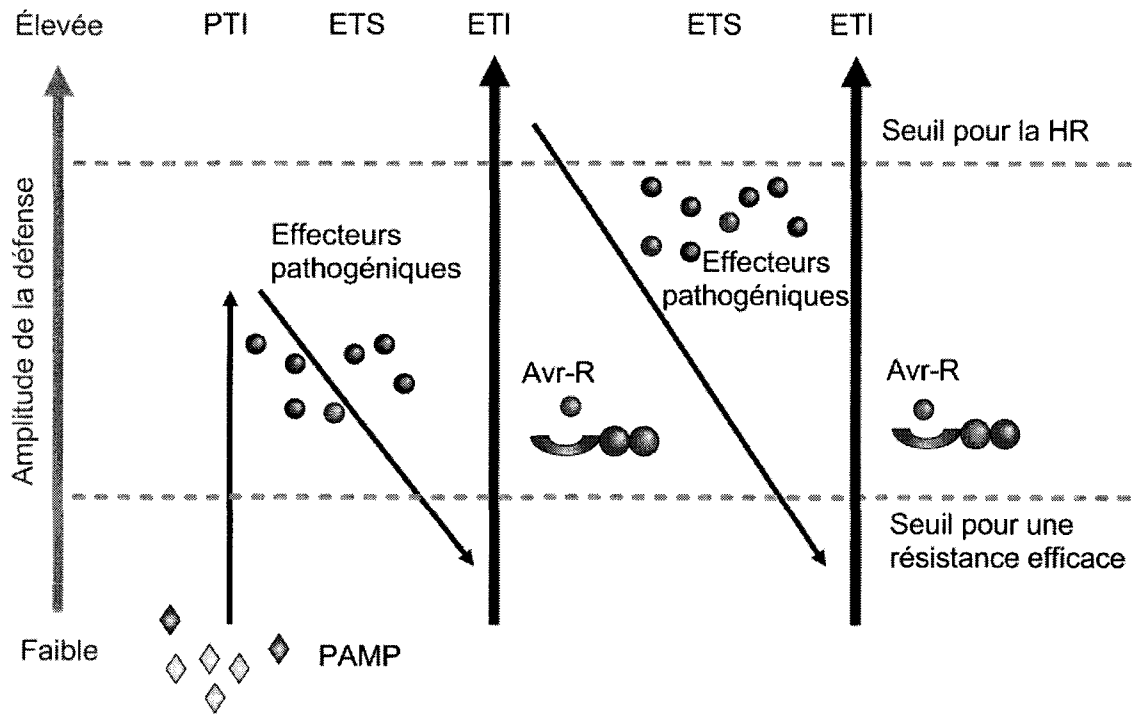
Phase I: Les MAMP sont reconnus par les PRR menant à la PTI, ce qui met fin à la colonisation.

Phase II: Les agents pathogènes réussissant à surmonter la phase I déploient des effecteurs contribuant à leur virulence. Ces effecteurs peuvent interférer avec la PTI, résultant en une susceptibilité conduite par des effecteurs (ETS).

Phase III: Un effecteur donné est reconnu spécifiquement par une des protéines NB-LRR, résultant en l'ETI, de manière directe ou indirecte. L'ETI est une réponse PTI accélérée et amplifiée, résultant en la résistance à la maladie et peut être accompagnée d'une HR avec mort cellulaire au site d'infection. La HR retarde la croissance des agents pathogènes biotrophes.

Phase IV: la sélection naturelle conduit les agents pathogènes à annuler l'ETI soit par perte ou diversification du gène de l'effecteur reconnu, ou par l'acquisition d'effecteurs additionnels qui suppriment l'ETI. La sélection naturelle résulte dans de nouvelles spécificités des gènes *R* de manière que l'ETI puisse être reconduite.

Certaines critiques (Boller and Felix, 2009; Poland et al., 2009) se sont fait entendre à propos de ce modèle puisqu'il ne permet pas d'intégrer les notions de résistance quantitative et qu'il sépare les PTI et ETI en mécanismes différents, alors qu'aucun fait ne permet de dire qu'ils ne sont pas régis par les mêmes mécanismes.



**Figure 2. Modèle en zig-zag réunissant en divers épisodes consécutifs les deux branches du système immunitaire végétal (immunité basale et résistance gène pour gène) en ajoutant une dimension par des gradients de défense et de pathogénicité.**

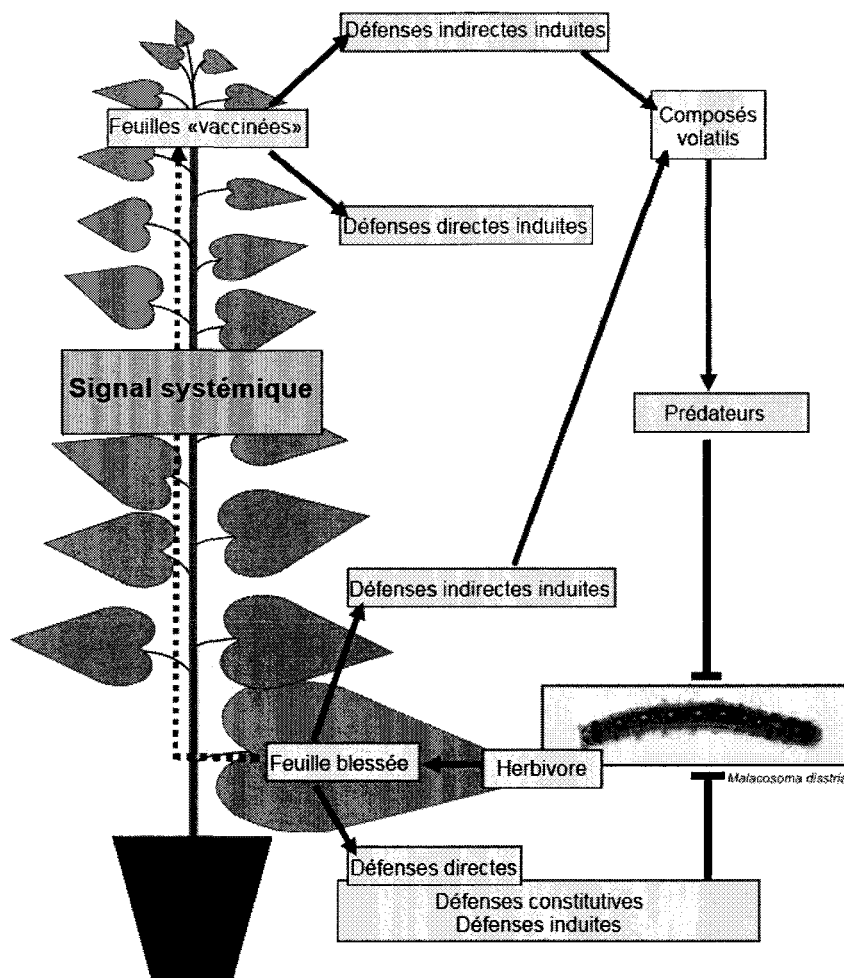
Adapté de Jones et Dangl (2006). L'hôte reconnaît les PAMP ce qui enclenche le processus de PTI. Les effecteurs pathogéniques sont déployés pour contourner la défense, résultant en une susceptibilité conduite par les effecteurs (ETS). L'effecteur (illustré en rouge) intercepté par une protéine d'avirulence (R) induit l'immunité conduite par des effecteurs (ETI). L'agent pathogène ayant perdu son gène de virulence reconnu et ayant acquis de nouveaux caractères (effecteurs en bleu) peut infecter de nouveau l'hôte, qui lui aussi doit acquérir de nouveaux caractères pour détecter l'agent pathogène et apporter une HR de nouveau.

## B.4 Résistance

L'état de résistance qui est créé localement souvent se propage au-delà de l'endroit où la plante a été attaquée, dans tout le système, et c'est ce qu'on appelle la résistance systémique acquise (SAR) (van Loon *et al.*, 2006a). Certains signaux viennent préparer la plante à donner une réponse de défense plus forte face à d'éventuelles attaques d'un grand spectre d'agents pathogènes différents. Cette résistance systémique induite et de longue durée sert à empêcher la propagation de l'agent pathogène dans d'autres organes distaux qui n'ont pas été encore atteints (de Wit, 2007; Grant and Lamb, 2006; Heil et Ton, 2008). Une communication s'impose au sein de la plante, et est possible grâce à des signaux mobiles qui partent de l'organe infecté aux autres zones de la plante (figure 3). La communication à longue distance se produit par la translocation des signaux systémiques par les vaisseaux de la plante, ou encore par des signaux volatils. Les méthyl salicylate, jasmonates, acide azélaïque, terpénoïdes et autres composés volatils sont tous des signaux impliqués dans la résistance systémique (Shah, 2009).

La résistance à la maladie n'est pas toujours complète. La résistance dite quantitative est une résistance qui est exprimée comme une réduction de la maladie, plutôt qu'une absence complète de la maladie. En fait, les résistances quantitative et menées par les gènes *R* pourraient être conditionnées par les mêmes mécanismes génétiques (Poland *et al.*, 2009). Il y a un éventail de nuances entre la résistance complète et la susceptibilité totale. Souvent, la différence entre susceptibilité (interaction compatible) et résistance (interaction incompatible) ne semble pas liée dans l'expression de tel ou tel ensemble de gènes, mais plutôt à des différences dans la rapidité de la reconnaissance de l'agent pathogène et de l'activation des mécanismes de défense, ainsi qu'à l'amplitude des réactions de défense (Bari et Jones, 2009; van Loon *et al.*, 2006b).





**Figure 3. Résistance systémique chez un plant de peuplier.**

Tiré de Philippe et Bohlmann (2007). Un signal partant de la feuille blessée se rend dans toutes les feuilles de la plante. Les mécanismes de défenses induites se mettent en branle. Les défenses peuvent attaquer directement l'agent pathogène (dans ce cas-ci, l'herbivore *Malacosoma disstria*) ou indirectement en relâchant des composés volatils qui viendront attirer les prédateurs ou les parasites de l'agent pathogène.

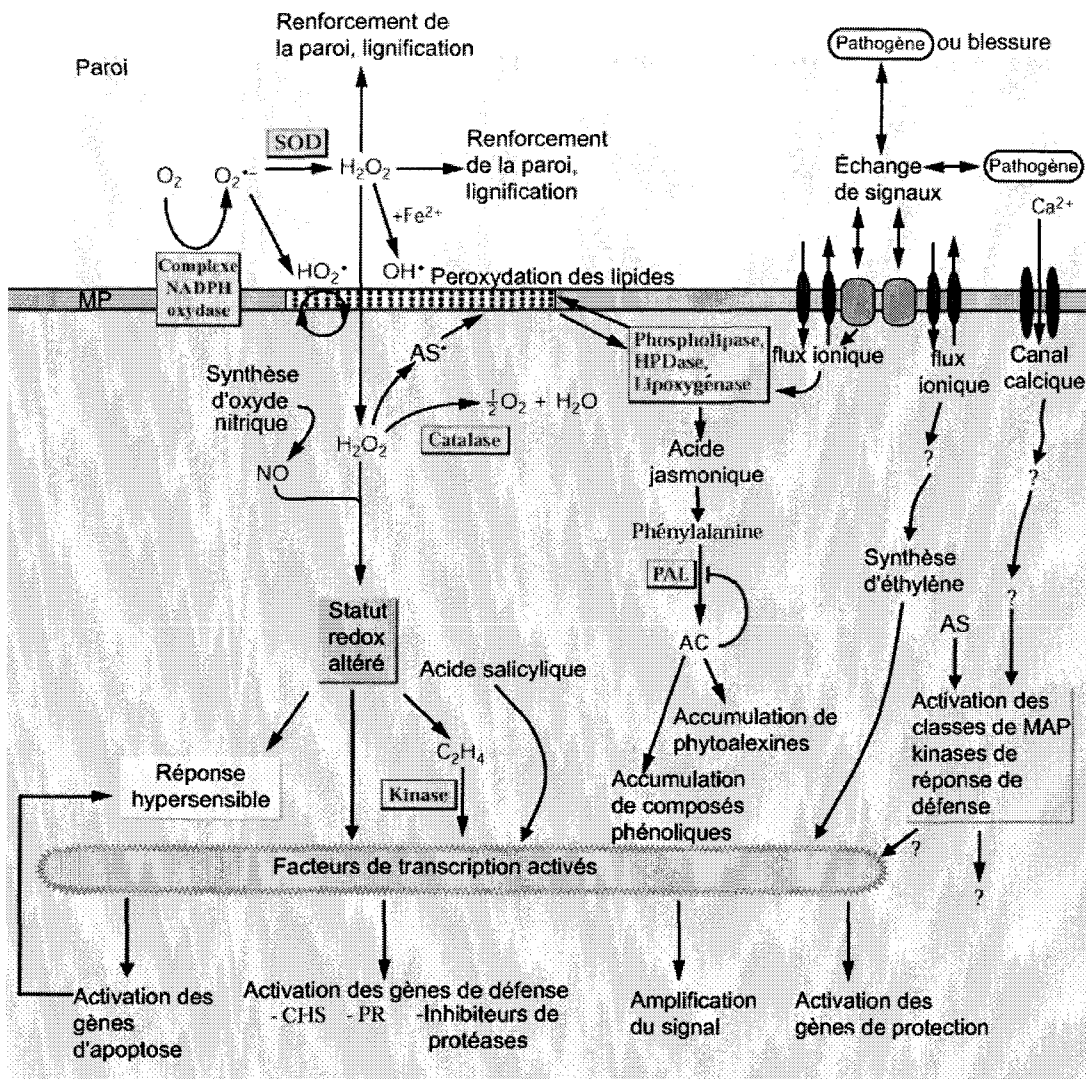
## B.6 Signalisation

Avant d'élaborer une réponse de défense appropriée, différentes voies de signalisation sont activées après l'interception de signaux de danger (Boller et Felix, 2009). Les réponses les plus rapides se manifestent en moins de 5 minutes. Des changements de flux ioniques de  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$  et  $K^+$  se font au travers de la membrane plasmique, amenant à la dépolarisation de la membrane (figure 4). L'ion calcium  $Ca^{2+}$  servirait de second messenger, potentiellement pour activer les protéines kinases dépendantes au calcium. La flambée oxydative se produit de manière intense et transitoire. Le dioxygène est réduit, ce qui mène à la formation d'oxygène sous forme active, comme l'anion superoxyde  $O_2^-$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et le radical hydroxyle  $OH^\cdot$ . Les FAO, hautement réactives et toxiques, sont produites à l'aide de différentes enzymes, entre autres des NADPH oxydases, peroxydases et superoxyde dismutases (SOD) (figure 4). Les FAO ont des propriétés antimicrobiennes et sont impliquées dans la fortification des parois cellulaires végétales. Il y a également synthèse d'oxyde nitrique (NO), qui collabore avec les FAO pour éliminer les agents pathogènes et induire la mort cellulaire programmée (MCP) (de Pinto *et al.*, 2006). Le NO est également impliqué dans la transcription de gènes reliés à la défense tel *PR-I* et d'autres impliqués dans la détoxification des FAO, comme la glutathion-S-transférase (*GST*) (Delledonne *et al.*, 2001). Les FAO entraînent des peroxydations en chaîne des lipides membranaires; phospholipases et lipoxygénases sont impliquées dans le phénomène. Ces produits sont en fait les précurseurs de l'AJ, qui est l'une des hormones végétales impliquées dans les réponses de défense. Finalement, dans les réponses précoces on retrouve également une activation des protéines kinases de la classe des MAP, menant à l'activation de facteurs de transcription, en plus d'une augmentation de phosphorylation de protéines. À la suite de cette série de changements, d'autres réponses sont enclenchées, dans les 5 à 30 minutes suivant la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante. On note une augmentation de l'éthylène, hormone de stress, et de l'aminocyclopropane acide carboxylique (ACC) synthase, qui est une enzyme impliquée dans la synthèse d'éthylène. Les facteurs de transcription activés déclenchent la transcription de gènes. Les analyses de micropuces, démontrant la reprogrammation transcriptionnelle chez

*Arabidopsis thaliana* en contexte de défense, ont révélé qu'en plus des gènes *R*, plusieurs centaines ou milliers de gènes ont une expression différente après l'activation de la défense (Eulgem, 2005). Parmi les gènes activés, notons les chalcone synthases (*CHS*), les *PR* et les inhibiteurs de protéases. La plupart des protéines *PR* possèdent *in vitro* une activité antimicrobienne contre les bactéries et champignons. D'autres gènes exprimés viendraient contribuer à l'amplification de la réponse de défense et à la protection de la plante. De plus, des gènes impliqués dans la MCP sont également transcrits afin de créer la HR.

## **B.7 Hormones végétales impliquées dans la défense**

Différentes hormones végétales participent à la réponse de défense en tant que messagers (figure 4). L'éthylène y a un rôle majeur, en tant que messager secondaire impliqué dans la résistance à la maladie (van Loon *et al.*, 2006a). Cette hormone stimule et amplifie les réponses de défense aux agents pathogènes, à la blessure mécanique et à la blessure causée par les herbivores. Dans les interactions incompatibles, la HR est associée une flambée de production d'éthylène qui arrive dans les mêmes temps que l'apparition de nécrose (van Loon *et al.*, 2006a). Deux autres hormones végétales, l'AJ et l'AS, ont des rôles complémentaires dans la réponse de défense. L'AJ active les réponses à la blessure et aux insectes phytophages. L'AS est accumulé lors de la SAR et lors d'attaques par des agents pathogènes biotrophes. Lorsque la voie de synthèse de l'une de ces deux hormones se met en marche, la voie de l'autre ralentit grandement: ce sont des voies antagonistes. La plante peut alors activer soit la voie de l'AJ, soit la voie de l'AS, mais pas les deux en même temps. La signalisation de défense dépendrait donc de la nature de l'agent pathogène et de son mode d'action. Les signalisations de l'éthylène et de l'AJ opèrent de manière synergique pour l'activation de la défense contre les nécrotrophes (Grant et Jones, 2009). Plusieurs autres hormones sont impliquées dans des voies de signalisation en trait à la défense, mais à ce jour elles restent peu étudiées (Bari et Jones, 2009).



**Figure 4. Aperçu des voies de signalisation impliquées dans les réponses de défense.**

Modifiée de Buchanan *et al.* (2000). La cellule végétale, par ses récepteurs membranaires, perçoit des signaux provenant de l'agent pathogène ou des signaux de blessure. Il y a des changements de flux ioniques qui se produisent au niveau membranaire, ce qui déclenche la flambée oxydative. Il y a création de FAO qui viennent altérer l'équilibre redox, qui lui intervient dans la HR la synthèse d'éthylène et l'activation des facteurs de transcription. Le peroxyde d'hydrogène intervient aussi dans la fortification de la paroi cellulaire et la peroxydation des lipides. Les composés issus de la peroxydation des lipides entrent dans la voie de synthèse de l'AJ. Finalement, les MAPK, l'AJ, l'AS et l'éthylène viennent activer des facteurs de transcription, qui eux, permettent la transcription de gènes de protection, d'amplification du signal, reliés à la défense et finalement à la mort cellulaire programmée.

## C – LE PEUPLIER COMME SYSTÈME MODÈLE

Le peuplier est un système modèle de choix en raison de divers avantages: l'un d'eux est qu'il est facilement transformable par *Agrobacterium* (Cseke *et al.*, 2007). Il est aussi le premier arbre dont le génome a été entièrement séquencé (Tuskan *et al.*, 2006) à cause de la faible taille de son génome. Son cycle de vie long permet l'étude de certains phénomènes qui n'existent pas chez les plantes modèles tels que la formation du bois et la sénescence automnale (Jansson et Douglas, 2007). D'ailleurs, le peuplier reste une espèce évolutivement près de la plante modèle *Arabidopsis*; les fonctions des gènes sont souvent conservées entre orthologues (Jansson et Douglas, 2007). Le peuplier a également une importance économique non négligeable et est présent sur la majorité des continents.

Le peuplier est utilisé dans les plantations parce qu'il pousse rapidement, densément et donne un bois valorisé. Sous le climat français, la productivité peut atteindre 20 m<sup>3</sup> par hectare par année, ce qui est quatre à cinq fois plus que les autres feuillus indigènes (Berthelot et Chantre, 2004). Comme les cultivars plantés sont peu diversifiés, la populiculture est sensible au moindre changement pathologique. Des agents pathogènes, endémiques en forêt naturelle, peuvent se retrouver à l'état épidémique dans les plantations de peuplier, causant des dommages importants (Gagné, 2005). Les arbres affaiblis deviennent la proie d'agents pathogènes secondaires, ce qui peut causer la mort des arbres (Frey et Pinon, 2004).

En France, depuis 1997, une épidémie frappe chaque année les surfaces plantées avec la variété «Beaupré». En 1994, l'agent pathogène de la rouille foliaire (*Melampsora larici-populina* Kleb.) a acquis le portfolio de gènes nécessaires à contourner la résistance déployée par le «Beaupré», lui permettant depuis d'infecter avec succès cette variété, ce qui provoque des pertes de croissance de l'arbre jusqu'à 60% de l'accroissement annuel en circonférence (Berthelot et Chantre, 2004). Au Québec, la rouille européenne (*M. larici-populina*) a

récemment fait son apparition et représente une menace pour la populiculture étant donné l'absence de résistance à cette espèce chez les peupliers d'ici.

L'étude sur les arbres permet, entre autres, de voir l'adaptation des mécanismes de défense à long terme. Les espèces pérennes ont une plus grande probabilité de se faire attaquer par des agents pathogènes avant leur stade de reproduction. De plus, leur croissance plus lente les rend inaptes à suivre rapidement l'évolution des agents pathogènes qui eux ont plusieurs générations chaque année. En tenant compte de ceci, les mécanismes de défense des plantes à cycle de vie court ne s'appliquent peut-être pas systématiquement aux espèces pérennes.

## **D – RÔLES DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION**

### **D.1 Généralités**

L'expression des gènes eucaryotes est assujettie à une modulation fine pour permettre la transcription au bon endroit et au bon moment. Pour cela, la transcription effectuée par l'ARN polymérase II est soumise à toute une panoplie de régions régulatrices, la plupart étant situées dans la région promotrice, c'est-à-dire la séquence en amont de la région codante du gène qu'elle régule. Souvent, c'est la boîte TATA, placée à environ 30 paires de bases (pb) du site de départ de la transcription qui permet le recrutement de l'ARN polymérase II. Des éléments voisins de la boîte TATA, appelés éléments *cis*, stimulent la transcription. Ils sont composés de motifs spécifiques reconnus par la protéine correspondante, impliquée dans l'initiation de la transcription. Les facteurs de transcription permettent d'effectuer la régulation transcriptionnelle en se liant ou en relâchant la séquence nucléotidique en amont des gènes qu'ils régulent. Plusieurs facteurs activent la transcription mais certains la répriment. Les éléments *cis* peuvent être situés à plusieurs centaines de kilobases (kb) du site d'initiation de la

transcription. Les facteurs de transcription liés à ces éléments lointains peuvent être en contact avec le complexe d'initiation de la transcription en repliant l'ADN pour en faire une boucle, rapprochant l'élément cis de la boîte TATA. Ce repliement peut avoir lieu par une liaison avec d'autres facteurs de transcription, ou encore avec des éléments de la machinerie transcriptionnelle. En fait, un point critique de la régulation est la transcription des gènes codant pour les facteurs de transcription eux-mêmes (Lodish *et al.*, 1997). Plusieurs facteurs de transcription ne s'expriment que dans certains types cellulaires, ou que dans certains états de la cellule, par exemple lors de la division, de la floraison, ou encore lors d'une attaque par des microorganismes pathogènes.

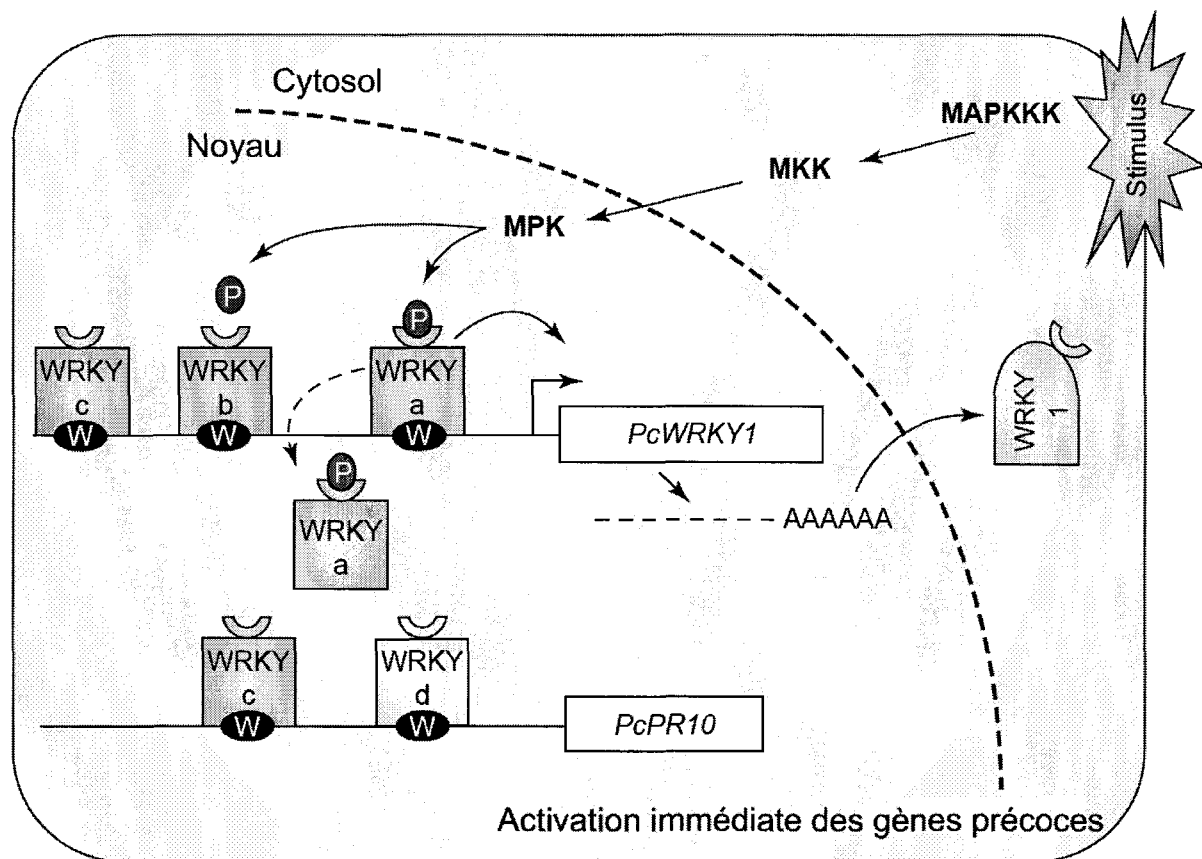
Les plantes ont la possibilité de moduler leur réponse de défense à la fois par l'intensité de cette réponse mais également en la modifiant dans le temps. Cette régulation peut avoir lieu à différentes étapes de l'expression du gène et est particulièrement importante lors de la transcription. La transcription est soumise à une combinaison de facteurs de transcription, activateurs et répresseurs, qui s'attachent ou relâchent les éléments cis du gène qu'ils régulent. Plusieurs familles de facteurs de transcription sont impliquées dans la régulation génique de la défense (Eulgem, 2005).

## **D.2 Régulation de la transcription par les protéines WRKY**

Les protéines WRKY font partie d'une grande famille de facteurs de transcription, présente chez les plantes et plusieurs autres eucaryotes. Il y aurait 72 gènes *WRKY* dans le génome d'*Arabidopsis*, 104 chez le peuplier et plus de 100 chez le riz (Dong *et al.*, 2003). On a retrouvé également des représentants WRKY chez les fougères (e.g. *Ceratopteris richardii*), les mousses (e.g. *Physcomitrella patens*), les algues vertes (e.g. *Chlamydomonas reinhardtii*), les protistes unicellulaires (e.g. *Giardia lamblia*), ainsi que chez les amibes (e.g. *Dictyostelium discoideum*), ce qui porterait à croire que les gènes WRKY sont apparus chez les eucaryotes il

y a 1,5-2 milliards d'années, pour ensuite se diversifier chez les plantes mais disparaître chez les animaux et les levures (Ulker et Somssich, 2004). Les protéines WRKY étudiées à ce jour sont, pour la plupart, impliquées dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques (Pandey et Somssich, 2009). Elles partagent toutes un ou deux domaines de liaison à l'ADN, nommés domaines WRKY, qui comprennent la séquence peptidique conservée WRKYGQK et un motif doigt de zinc. Ce domaine se lie à la boîte W, dont la séquence nucléique est TTGAC/T, incluant la séquence-cœur, TGAC. Ce domaine est également situé dans les promoteurs des gènes régulés par les WRKY (Li *et al.*, 2006; Du et Chen, 2000). On sait maintenant que les facteurs de transcription de la famille WRKY lient préférentiellement certains nucléotides à d'autres de chaque côté de la boîte W, mais d'autres études doivent être faites pour déterminer s'il n'y aurait pas un motif plus précis (Ciolkowski *et al.*, 2008). Un agencement palindromique de boîtes W viendrait augmenter significativement le niveau d'expression du gène régulé (Cormack *et al.*, 2002). Les WRKY sont divisés en trois groupes (Eulgem *et al.*, 2000). Le groupe I comporte les protéines avec deux domaines WRKY. Le groupe II regroupe les protéines WRKY qui contiennent un seul domaine WRKY, soit la plupart des protéines WRKY. Le motif doigt de zinc de ces premiers groupes est de type C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>, alors que pour le groupe III il est de type C<sub>2</sub>-HC. Peu importe le type, le motif doigt de zinc semble fonctionnel et important (Cormack *et al.*, 2002). Les WRKY semblent fonctionner en réseau, comme régulateurs positifs et négatifs de la réponse de défense. Étant donné le nombre important de membres dans la famille, certains WRKY ont des fonctions redondantes et d'autres, doubles (Pandey et Somssich, 2009). Par ailleurs, la formation d'homodimères augmenterait le taux de transcription (Cormack *et al.*, 2002). Les promoteurs des gènes *AtWRKY* inductibles aux agents pathogènes sont fortement enrichis en boîtes W, suggérant que les boucles de régulation par les WRKY constituent un principe général dans les réponses immunes des plantes (Dong *et al.*, 2003). Le réseau WRKY pourrait à la fois induire rapidement les réponses de défense et les diminuer peu après afin de limiter les dégâts causés à la plante par ses propres molécules.





**Figure 5. Modèle hypothétique selon lequel les facteurs de transcription WRKY seraient constitutivement liés au promoteur.**

Adapté de Ulker et Somssich (2004). Après réception d'un signal, les MAPK viendraient modifier la conformation des WRKY pour activer la transcription des gènes de défense ainsi que leurs propres gènes. Les protéines WRKY activées pourraient aussi prendre la place de facteurs WRKY constitutivement liés aux boîtes W.

Une étude de Shen et al. (2007) a démontré une association physique entre une protéine R et deux facteurs de transcription WRKY, suggérant que le récepteur activé ciblerait ces facteurs de transcription. Les promoteurs des gènes *PR-1* et d'autres gènes de défense régulés de la même manière ont un enrichissement en boîtes W, ce qui suppose que les facteurs de transcription WRKY ont un rôle majeur dans la régulation des gènes de défense (Maleck et al., 2000). Ulker et Somssich (2004) ont émis l'hypothèse que les protéines WRKY seraient

liées constitutivement aux boîtes W du promoteur, mais modifiées par des kinases de type MAPK en période de stress (figure 5). D'ailleurs, il a déjà été démontré qu'une cascade de MAPK viendrait agir sur des facteurs de transcription WRKY pour conférer une résistance contre des agents pathogènes bactériens et fongiques (Asai *et al.*, 2002).

Certains WRKY ont reçu une attention particulière de la part des chercheurs; WRKY70 dans le modèle *Arabidopsis* en est un bon exemple. Lorsque exprimé constitutivement, il améliore la résistance amenée par l'AS mais compromet la résistance conduite par l'AJ; il agirait donc comme activateur des gènes induits par l'AS et répresseur de ceux induits par l'AJ (Li *et al.*, 2004). La surexpression de WRKY70 augmenterait la résistance au champignon biotrophe *Erysiphe cichoracearum*, mais rendrait susceptible au champignon nécrotrophe, *Alternaria brassicicola* (Li *et al.*, 2006). Cependant, l'inactivation de WRKY70 n'altérerait pas les réponses des voies de l'AJ et de l'AS (Ren *et al.*, 2008), ce qui renforcerait l'hypothèse selon laquelle les WRKY ont des fonctions redondantes (Eulgem 2005). Finalement, ce facteur de transcription serait même impliqué dans la sénescence (Ulker *et al.*, 2007). Les gènes *AtWRKY18*, *AtWRKY40* et *AtWRKY60* partagent partiellement certaines fonctions dans la régulation de la défense chez l'*Arabidopsis*. Les doubles mutants de perte de fonction *wrky18/40*, *wrky18/60* et le mutant triple *wrky18/40/60* sont plus résistants à la bactérie hémibiotrophe *Pseudomonas syringae* comparativement à des plants sauvages (Xu *et al.*, 2006). Cependant, ces mêmes mutants sont plus susceptibles au champignon *Botrytis cinerea*, qui lui est nécrotrophe (Xu *et al.*, 2006). Paradoxalement, l'expression constitutive de *WRKY18* augmente la résistance d'*Arabidopsis* à *P. syringae* alors que les coexpressions de *WRKY18/40* ou *WRKY18/60* rendent les plantes plus susceptibles aux deux agents pathogènes (Xu *et al.*, 2006). Dans une autre étude, on rapporte que les mutants *wrky18*, *wrky40*, *wrky60*, *wrky18/60* et *wrky40/60* sont plus susceptibles à l'agent pathogène *Golovinomyces orontii*, qui cause le mildiou, alors que les mutants *wrky18/40* et *wrky18/40/60* démontrent une résistance presque totale (Shen *et al.*, 2007). Le double mutant *wrky18/40* est résistant à *G. orontii*, mais développe plus de nécroses, ce qui suggère que WRKY18 et WRKY40 ont des rôles de répresseur de la défense et viendraient freiner les réactions de défense avant d'atteindre un

seuil néfaste pour la plante (Shen *et al.*, 2007). En contraction avec cette étude, une autre équipe a démontré que WRKY18 serait un facteur de transcription positif nécessaire à l'induction de la SAR (Wang *et al.*, 2006).

### D.3 WRKY23

Chez *Arabidopsis*, le facteur de transcription WRKY23 semble être un régulateur négatif de la réponse de défense. En effet, une sous-expression de *AtWRKY23* entraîne une meilleure résistance de la plante au nématode (Grunewald *et al.*, 2008). Notre laboratoire a démontré que *PtWRKY23*, l'orthologue de WRKY23 d'*Arabidopsis*, est impliqué dans la régulation de la défense (Levéé *et al.*, 2009). Le nombre de transcrits de *PtWRKY23* double 3 jours après la mise en contact avec l'agent pathogène causant la rouille du peuplier *M. medusae*. *PtWRKY23* est également surexprimé après blessure mécanique, traitement au chitosane (un des composants de la paroi des mycètes, qui déclenche la PTI) ou traitement à l'AS. Des peupliers transgéniques surexprimant et sous-exprimant le gène *PtWRKY23* ont été créés. Des analyses par micropuces ont été réalisées à partir des plants surexprimeurs: près de 600 gènes ont une expression quantitativement différente par rapport au peuplier non modifié. Du nombre total de gènes dérégulés, 402 sont sous-exprimés alors que les 195 autres gènes sont surexprimés: ces données suggèrent que *PtWRKY23* est un régulateur négatif, agissant directement ou indirectement sur l'expression de ces gènes dérégulés. La plupart des gènes dérégulés sont reliés au métabolisme, au stress, à la transcription ou à la signalisation traductionnelle. Les gènes réprimés dans ces mêmes plants sont en majeure partie des gènes participant au métabolisme, entre autres dans la synthèse de la lignine et dans la construction de la paroi cellulaire. D'ailleurs, la sous-expression de *PtWRKY23* résulte en une plus grande lignification de la vascularisation de la feuille près des sites d'infection par *M. medusae*: *PtWRKY23* semble donc réduire l'accumulation de lignine après une infection. Comparativement à des plants sauvages, les plants surexprimeurs, lorsque blessés, accumulent moins de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alors que les sous-exprimeurs, au contraire, en accumulent davantage. D'ailleurs, ces résultats

correspondent avec la quantification de l'activité peroxydase, qui détoxifie en transformant le peroxyde en H<sub>2</sub>O, qui est deux fois plus élevée dans les surexprimeurs et 1,9 fois moindre dans les sous-exprimeurs (Levée *et al.*, 2009). Des analyses par micropuces ont été réalisées à partir des plants surexprimeurs; des 597 gènes dérégulés, près de la moitié sont communs avec les gènes induits par la rouille. Les deux types de lignées transgéniques ont une susceptibilité plus importante à la rouille que ne l'est le plant sauvage. De plus, les mêmes observations ont été faites sur des lignées transgéniques de clone NM6 (*Populus nigra* × *Populus maximowiczii*) surexprimant ou sous-exprimant *PtWRKY23*. Ces lignées sont plus susceptibles à *M. medusae* f.sp. *tremuloidae* (*Mmt*), alors que le clone NM6 sauvage est résistant à *Mmt*. La modification de l'expression de *PtWRKY23* viendrait compromettre la résistance à la rouille. Une explication plausible serait que WRKY23 aurait un effet sur un autre facteur de transcription dans les plants sous-exprimeurs, qui lui engendrait l'état de susceptibilité. Une autre serait que WRKY23 aurait des fonctions opposées selon le type cellulaire, que viendrait influencer la surexpression ou la sous-expression du transgène.

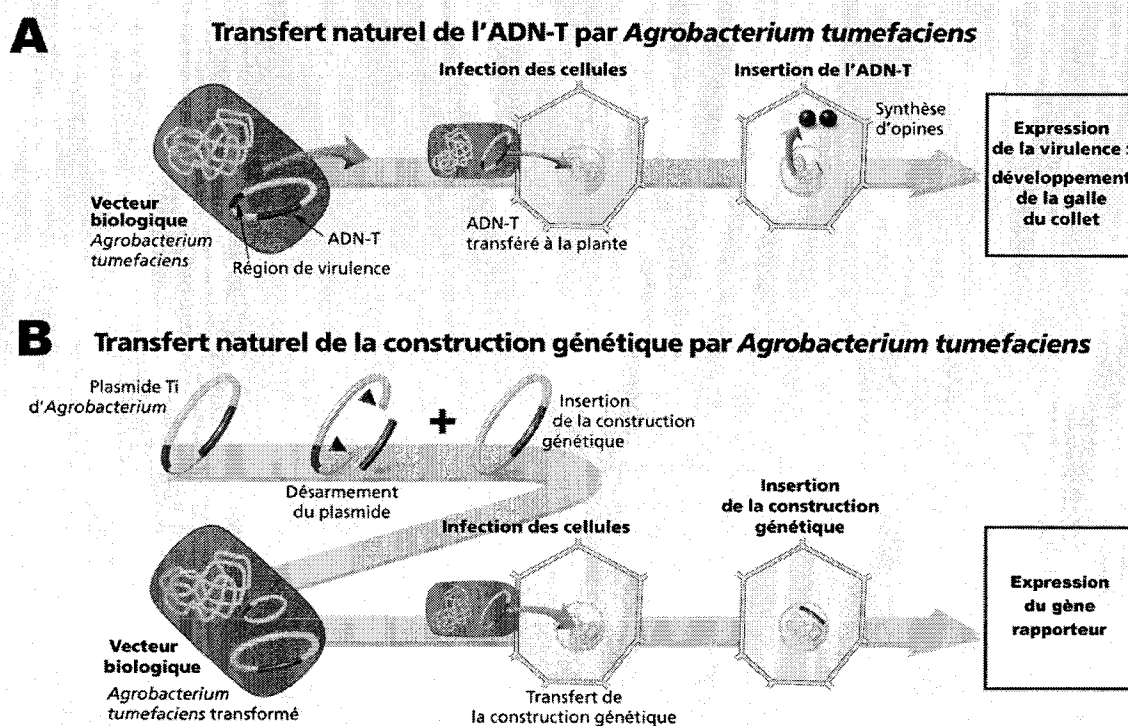
## **E – EXPRESSION TRANSITOIRE PAR AGROBACTERIUM**

L'insertion d'un ADN exogène et la synthèse de la protéine qu'il code dans la cellule transformée est transitoire lorsqu'il n'y a pas de processus de sélection forçant la cellule à conserver cette construction. On utilise cette méthode pour vérifier la localisation cellulaire d'une protéine, de produire une protéine à petite échelle, ou qu'une protéine est exprimée dans un certain contexte selon la régulation exercée par le promoteur de son gène.

## E.1. Mécanisme

L'*Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie du sol causant la tumeur du collet chez les végétaux. Elle infecte son hôte au niveau d'une blessure racinaire ou du collet et lui transmet un plasmide qui comporte des éléments génétiques spécifiques (figure 6). Les cellules végétales infectées sont piratées par les gènes de l'agent pathogène qui peut alors utiliser la machinerie cellulaire de la plante à ses propres fins, synthétisant des opines, en plus d'entraîner la surproduction d'hormones de croissance végétale, et c'est ce qui causera la formation de tumeurs sur la plante. Le processus de la transformation génétique de cellules végétales par l'*Agrobacterium* repose sur les activités d'un large plasmide induisant la tumeur (Ti) résidant dans les souches virulentes. Les protéines codées par les gènes d'induction de tumeur (*vir*) de ce plasmide permettent la reconnaissance, l'attachement de la cellule hôte et le transfert génique. Une portion du plasmide Ti, l'ADN transféré (ADN-T), est transférée dans les cellules de la plante, intégrée dans le génome nucléaire, et exprimée. Le résultat en est la production d'enzymes qui catalysent la synthèse d'hormones végétales, responsables de la croissance de la tumeur, et la formation d'opines, qui servent de source de carbone et d'azote pour l'agrobactérie. L'expression des gènes de l'ADN-T de la bactérie se fait donc avec la machinerie cellulaire de l'hôte (Citovsky *et al.*, 2007; Gelvin, 2003; McCullen et Binns, 2006).

Certains facteurs sont très importants pour le succès de l'agro-infection, comme la qualité du matériel végétal et le génotype de la plante (Santos-Rosa *et al.*, 2008). Des plants en bonne condition physiologique obtiennent un meilleur taux de transformation que des plants qui ont une division cellulaire plus ralentie. Également, certaines espèces de peuplier sont faciles à transformer alors que d'autres nécessitent des mesures plus élaborées pour y arriver (Cseke *et al.*, 2007).



**Figure 6. Transformation par *Agrobacterium*, du phénomène naturel à l'utilisation en laboratoire**

Adapté d'un schéma du Groupement national interprofessionnel des semences et plants ([www.gnis.fr](http://www.gnis.fr)).

A. L'ADN-T de la bactérie est intégré dans le génome de la plante, permettant la synthèse de protéines bactériennes par la machinerie traductionnelle végétale, ce qui cause le développement de tumeurs.

B. Pour permettre l'expression du gène d'intérêt plutôt que des gènes bactériens, la région de virulence est conservée sur un plasmide différent et l'ADN-T est remplacé par le gène d'intérêt. Lors de l'infection, il y aura transfert de la construction génétique puis expression du gène rapporteur sans qu'il n'y ait de tumeur.

## E.2 Vecteurs binaires

Les vecteurs binaires ont révolutionné l'utilisation d'*Agrobacterium* pour introduire des gènes dans les plantes. La région T et les gènes *vir* peuvent être séparés en deux réplicons différents, un plasmide portant la région T (le vecteur binaire), un autre contenant les gènes *vir* (plasmide Ti modifié). Le plasmide Ti modifié a une délétion au niveau de la région T, éliminant l'induction de tumeurs. Quand les deux réplicons sont dans la même cellule d'*Agrobacterium*, les produits des gènes *vir* peuvent agir en *trans* sur la région T et enclencher le transfert de l'ADN-T. Les vecteurs binaires peuvent aussi se manipuler dans *Escherichia coli*, et contiennent généralement un site de clonage multiple dans la région T où les gènes d'intérêt peuvent être clonés (Gelvin, 2003).

## E.3 Transformation stable et transitoire

Les plantes obtenues par transformation stable ont une insertion du gène d'intérêt dans l'ADN chromosomique, ce qui peut requérir la production de cellules embryogènes ou nécessiter l'organogénèse afin de générer des plants qui ont le caractère souhaité (Andrews et Curtis, 2005). Par contre, l'obtention des résultats par l'expression transitoire est plus rapide puisqu'il n'y a pas de sélection ni de génération de plants à faire, ce qui prend plusieurs semaines, ou même mois, selon l'espèce choisie. L'expression transitoire est définie par une expression rapide résultant de l'introduction de l'ADN-T qui ne fusionne pas avec l'ADN chromosomique et reste comme ADN épisomique dans le noyau de la cellule végétale (Andrews et Curtis, 2005; Collens *et al.*, 2007; Yoshioka *et al.*, 1996). L'expression génique prend place en quelques jours après l'introduction d'*Agrobacterium* dans les tissus de la plante. Comme il n'y a pas pression de sélection pour la prolifération des cellules contenant le gène d'intérêt, on privilégie la pénétration d'ADN-T dans le plus de cellules possible plutôt

que d'essayer de faire proliférer les rares cellules qui ont intégré dans leurs chromosomes le gène d'intérêt (Andrews et Curtis, 2005).

L'un des avantages d'utiliser l'expression transitoire par l'*Agrobacterium* est que la synthèse de protéines débute entre 36 et 48 heures après le départ de la co-culture (Yoshioka *et al.*, 1996). Le sommet temporel des niveaux protéiques est atteint approximativement 2 à 3 jours après la transfection (Yoshioka *et al.*, 1996). Après l'introduction de l'ADN dans le noyau végétal, une flambée d'expression génique précède l'intégration du transgène au génome. La transformation transitoire permet de détecter l'expression du gène introduit ainsi que de produire de petites quantités de la protéine d'intérêt en quelques jours.

#### **E.4 Avantages de l'utilisation de l'agrobactérie**

L'expression transitoire de gènes est un outil efficace pour analyser leurs fonctions dans la résistance à la maladie chez les plantes, par exemple pour étudier le rôle des stilbènes contre le mildou, en surexprimant une stilbène synthase dans des feuilles de vigne avant d'infecter avec le *Plasmopara viticola* (Santos-Rosa *et al.*, 2008). La transformation par l'*Agrobacterium* a été utilisée dans un bon nombre de plantes ainsi que dans plusieurs autres eucaryotes, allant jusqu'aux cellules humaines (Lacroix *et al.*, 2006). L'*Agrobacterium* a l'habileté de contourner des procédés cellulaires fondamentaux partagés par une majorité d'organismes eucaryotes, ce qui lui permet d'infecter des espèces aussi variées (Citovsky *et al.*, 2007). Virtuellement n'importe quel ADN cloné dans l'ADN-T peut être transféré dans des cellules végétales (McCullen et Binns, 2006).

Le bombardement d'ADN est une méthode alternative à l'agro-infection, permettant la pénétration de l'ADN dans les cellules par un moyen mécanique. L'utilisation de la méthode



par biolistique entraîne automatiquement une blessure, causée par le bombardement de billes d'or ou de tungstène dans un tissu. La blessure viendra possiblement activer certaines réponses de défense, ce qui peut être intéressant lorsqu'on veut étudier des cellules transformées avec la construction d'une région promotrice d'un gène de défense couplée à un gène rapporteur. La biolistique a par contre quelques désavantages, comme son coût élevé et sa méthodologie plus complexe. De plus les cellules d'un même échantillon ne sont pas toutes traitées de la même manière, cela dépend de leur localisation par rapport au rayon de bombardement. L'infection par l'*Agrobacterium*, quant à elle, est vraiment simple d'utilisation et permet de générer de grandes quantités de données (Berger *et al.*, 2007).

### **E.5 Avantages d'un système de cellules en suspension**

Il est avantageux d'utiliser des cultures de cellules en suspension plutôt que des feuilles ou plants entiers pour diverses raisons. Il est connu que les cellules végétales en division sont plus efficacement transformées (McCullen et Binns, 2006). Par exemple une culture de cellules en suspension de *Nicotiana glutinosa* a obtenu un plus grand taux d'expression du gène rapporteur que sa culture de racine, parce que la transformation sur cette dernière est limitée aux cellules en division active en surface du tissu (Collens *et al.*, 2007). Les cultures de cellules en suspension ont une croissance plus rapide que les cultures de racine, ce qui prend moins de temps pour générer du matériel végétal transformé. Les cultures de cellules en suspension peuvent avoir une population plus homogène et il est possible d'en produire de grands volumes. L'infiltration de feuilles est une technique rapide d'expression transitoire de protéines, mais elle nécessite la culture de plants entiers, ce qui peut être contraignant lors d'essais à grande échelle ou lors de la production de plusieurs protéines différentes (Andrews et Curtis, 2005). Finalement les cultures stables *in vitro* présentent l'avantage d'avoir moins de variabilité dans les résultats obtenus par rapport à des expériences utilisant des tissus entiers comme pour l'infiltration de feuilles (Andrews et Curtis, 2005). Cependant, un système de cellules en suspension ne permet pas de faire une localisation au niveau de la plante, par

exemple d'identifier les gènes exprimés dans tel organe. Certaines protéines ne sont synthétisées que dans certains organes : de telles molécules ne sont pas produites dans des cellules dédifférenciées.

## **E.6 Réponses de défense engendrées par l'*Agrobacterium***

Il est commun de voir que les plantes répondent différemment aux éliciteurs généraux de stress. Selon le système d'étude utilisé, les résultats obtenus sont contradictoires sur le fait qu'*Agrobacterium* induit ou non des réactions de défense. Une étude a démontré que des souches désarmées d'*Agrobacterium* entraînent l'expression du gène *PR-1* lorsque infiltré chez le *Nicotiana tabacum* (Pruss *et al.*, 2008). Une autre a révélé qu'*Agrobacterium* utilise la voie de signalisation des MAPK à son usage, pour le transport de son ADN-T dans le noyau de l'hôte (Djamei *et al.*, 2007). Plusieurs des réponses déclenchées par l'*Agrobacterium* semblent faire partie de la réponse générale aux bactéries, car des effets similaires sont observés en présence d'*Escherichia coli* (Ditt *et al.*, 2001; Pruss *et al.*, 2008). Dans le cadre de notre projet, l'expression des gènes candidats sera quantifiée afin d'évaluer l'influence d'*Agrobacterium* sur la réponse de défense dans le système employé ici.

## **F - HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**

### **F.1. Problématique**

Par le séquençage de son génome et la création d'outils en découlant, le peuplier est un système important dans l'étude des végétaux. Sa croissance rapide en fait un choix judicieux dans les plantations d'arbres. Cependant, la monoculture le rend sensible aux agents

pathogènes. De plus, le phénomène des changements climatiques et l'augmentation des voyages internationaux favorisent la rencontre entre agents pathogènes et hôtes qui n'ont pas co-évolué ensemble: les systèmes de défense des hôtes ne sont pas forcément adaptés à ces nouveaux agents pathogènes. Plusieurs rouages de la défense chez les plantes restent méconnus. Il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes de défense afin de pouvoir intervenir au mieux dans la lutte aux agents pathogènes émergents tout en favorisant la défense autonome de l'arbre. Les facteurs de transcription WRKY semblent jouer un rôle clef dans la défense des plantes. L'adaptation d'un système de transformation transitoire dans des cellules de peuplier permettrait une nouvelle approche dans l'étude de la régulation des gènes de défense.

## **F.2. Hypothèses**

La présence d'un nombre élevé de boîtes W dans la région promotrice d'un gène indique sa régulation par le facteur de transcription *PtWRKY23*. De plus, l'utilisation d'un système de transformation transitoire de cellules de peuplier permet l'étude des gènes régulés par *PtWRKY23*.

## **F.3. Objectifs**

- Obtenir une meilleure compréhension du mécanisme de régulation des facteurs de transcription WRKY. Pour atteindre cet objectif, il faudra:
  - déterminer les gènes potentiellement régulés par le facteur de transcription *PtWRKY23*.

- comparer le nombre de boîtes W dans cette liste de gènes et dans une série de gènes aléatoirement sélectionnés et non régulés par *PtWRKY23*.
- déterminer qualitativement à l'aide du rapporteur colorimétrique GUS l'expression des gènes transformés au sein des cellules de peuplier surexprimant ou exprimant de manière endogène le facteur de transcription *PtWRKY23*.

# CHAPITRE 1

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1 COMPTAGE DES BOÎTES W

À partir de plants de peuplier transgéniques surexprimant le gène *PtWRKY23*, des analyses par micropuces ont été faites (Levée *et al.*, 2009). De là, tous les gènes dont la différence d'expression (*fold change*) était supérieure à 2 ou inférieure à 0,50 et dont la valeur p est plus basse que 0,05 ont été sélectionnés, pour un total de 600 gènes. Les séquences des 2 000 paires de bases en amont de la région non traduite en 5' (5'-UTR) des promoteurs choisis ont été prises dans la banque de données du génome de peuplier séquencé, pour le clone Nisqually-1 (Tuskan *et al.*, 2006). Les motifs de la boîte W ont été repérés par le logiciel PLACE [<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html> (Higo *et al.*, 1999; Prestridge, 1991)]. La moyenne du nombre de boîtes W par séquence promotrice a été calculée, pour les gènes surexprimés, sous-exprimés ou dérégulés (les gènes surexprimés et les gènes sous-exprimés dans un même ensemble) par la surexpression de *WRKY23*. À titre comparatif, cette même moyenne a été calculée pour un ensemble de 156 gènes qui ne semblent pas régulés par *WRKY23*, c'est-à-dire la totalité des gènes dont la différence d'expression se situe entre 0,8696 et 1,15, et dont la valeur p est plus basse que 0,05, pour la même expérience faite par Levée (2009).

## 1.2 COMPARAISON AVEC ARABIDOPSIS

Un ensemble de gènes (tableau 1) a été sélectionné pour pousser plus en détails les analyses sur les promoteurs. Les gènes décrits dans la littérature comme étant impliqués dans la réponse de défense ont été retenus. Certains gènes dérégulés par la surexpression de *PtWRKY23* font également partie de l'ensemble de gènes étudiés. Les emplacements des boîtes W des séquences promotrices de peuplier ont été comparés avec ceux des orthologues putatifs d'Arabidopsis (trouvés sur [www.jgi.doe.gov](http://www.jgi.doe.gov)). Les séquences promotrices d'Arabidopsis ont été prises sur le site TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)).

**Tableau 1. Noms complets des gènes étudiés, avec gène modèle, identifiant de protéine et orthologue putatif d'Arabidopsis correspondants**

Nom du gène	Gène modèle	Protein ID	Orthologue putatif Arabidopsis
			(AGI locus identifier)
Mitogen-activated protein kinase <i>MAPK3-1</i>	estExt_fgensesh4_pm.C_LG_IX0462	833180	At3g45640
Vegetative storage protein <i>PNI288</i>	eugene3.00190336	573862	At4g24340
Chalcone synthase <i>CHS3</i>	estExt_fgensesh4_pg.C_LG_I0450	814872	At5g13930
Chalcone synthase <i>CHS6</i>	eugene3.00031462	554829	At5g13930
Kunitz trypsin inhibitor <i>TI4</i>	eugene3.00040289	555576	At1g17860
Kunitz trypsin inhibitor <i>TI5</i>	gw1.XIX.2223.1	249823	At1g73325
Zinc finger protein <i>ZFP1</i>	grail3.0022029401	659738	At2g28710
Zinc finger protein <i>ZFP</i>	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIV0633	730802	At1g27730
Polyphénol oxydase <i>PPO1</i>	eugene3.00110805	568791	Pas d'orthologue
Hevein <i>PR-4</i>	estExt_fgensesh4_pg.C_LG_XIII0199	823674	At3g04720
Cyclin-dependent protein kinase 2 <i>CDC2</i>	grail3.0056004702	648419	At3g48750
Eukaryotic translation initiation factor 4 <i>EIF4</i>	estExt_Genewise1_v1.C_LG_VI0160	716781	At3g13920

Ces informations sont tirées du site internet du JGI ([www.jgi.doe.gov](http://www.jgi.doe.gov)).

### 1.3 CULTURE CELLULAIRE

Une suspension cellulaire du clone 717 (*Populus tremula* x *Populus alba*) a été développée à partir de sections d'entre-nœuds de plants cultivés *in vitro*. Les sections ont été cultivées dans un milieu Murashige et Skoog (MS) organique à pH 5,7 contenant 30 g/L de saccharose, additionné de vitamines MS (Invitrogen, Carlsbad, CA), d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique à 5 µM, de glutamine à 0,05 mg/mL et de cystéine à 0,25 µg/mL, pendant une dizaine de semaines, toujours sous agitation, jusqu'à la prolifération de cellules dédifférenciées en suspension. Les cellules ont été cultivées dans le même milieu décrit ci-dessus, sous une agitation constante de 120 rotations par minute (rpm), à 22°C à l'obscurité. Elles sont repiquées aux 7 jours, en utilisant 10 mL de culture avec 30 mL de milieu frais.

### 1.4 CLONAGE DES PROMOTEURS ET DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION

Les séquences nucléiques des promoteurs ont été obtenues par PCR (94°C 20 sec, 72°C 3 min sur 7 cycles; 94°C 20 sec, 67°C 3 min pendant 32 cycles; 67°C 7 min) sur l'ADN génomique du clone Nisqually-1 (*P. trichocarpa*), à l'aide de la polymérase haute fidélité Advantage II de Clontech (Mountain View, CA) selon les recommandations du manufacturier. Les amorces (tableau 2) ont été élaborées à partir des données du séquençage du génome (JGI *P. trichocarpa* version 1.1; Tuskan *et al.*, 2006). Les séquences clonées sont d'environ 2 000 paires de bases en amont du codon ATG, site de départ de la traduction. Un premier clonage a eu lieu dans le vecteur pCR2.1, puis un sous-clonage a été fait dans le vecteur pCAMBIA1391z, en amont du gène *GUS* tel que décrit dans Vigneault *et al.* (2007). Le gène *PtWRKY23* (Levéé *et al.*, 2009) a été cloné en aval du promoteur d'*UBI*, dans le vecteur pCAMBIA2300 (Cambia, Brisbane, Australie). Ces constructions ont été transformées dans la souche AGL1 d'*Agrobacterium tumefaciens* tel que décrit par Chabaud *et al.* (2003).

## 1.5 TRANSFORMATION TRANSITOIRE PAR L'AGROBACTERIUM

### 1.5.1 Co-culture

Les différentes étapes de l'agrotransformation ont été adaptées de la méthode décrite par Berger *et al.* (2007). Les cellules d'*Agrobacterium* étaient cultivées avec de la kanamycine à 50 µg/mL et de la carbénicilline à 25 µg/mL à partir de souches congelées, toute la nuit à 28°C. La production de la deuxième culture se fait sous les mêmes conditions de croissance mais avec l'ajout d'acétosyringone à une concentration de 50 µM. Les bactéries ont été centrifugées et resuspendues afin d'être 4 fois plus concentrées qu'une densité optique (DO) équivalente à 1, dans le milieu pour cellules 717 supplémenté de 100 µM d'acétosyringone. Les cellules de peuplier (72 heures après repiquage, diluées 1/4 dans leur milieu contenant 100 µM d'acétosyringone) ont été distribuées dans des plaques de culture cellulaire en polystyrène à 6 puits (Cellstar Greiner Bio-one, Monroe NC), à raison de 3 mL par puits. Les bactéries sont ajoutées à une DO de 0,3. La co-culture se fait de 4 à 6 jours, à l'obscurité à 22°C sous une agitation de 120 rpm.

Deux souches d'*Agrobacterium* (l'une contenant le promoteur, l'autre, le facteur de transcription WRKY23) sont utilisées par épisode de transformation. Des quantités égales de chaque souche ont été distribuées dans les puits, pour un total de cellules bactériennes équivalant à une DO de 0,3 ou 0,6. Ces échantillons sont comparés à des témoins infectés par deux souches, l'une contenant la construction du promoteur, l'autre contenant le même vecteur mais vide, sans facteur de transcription, afin d'obtenir les mêmes quantités de bactéries ayant le promoteur et de bactéries totales. Ces mêmes principes ont été utilisés pour l'expérience de transformation transitoire des cellules, à l'exception où il n'y a pas eu d'ajout de cellules bactériennes contenant le facteur de transcription.



**Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour le clonage des séquences promotrices des gènes suivants, à partir d'ADN génomique de *P. trichocarpa*.**

Nom du gène	Amorce sens
	Amorce anti-sens
<i>MAPK3-1</i>	5'-GGTTCTTTTCGAGCACAGGTAAGG-3'
	5'-GTCCTCGGTTTCTTTTCTGTTGTCTG-3'
<i>VSP</i>	5'-CGGGATCCCGTTCGTCGAGCTATCAATCAGACTC-3'
	5'-GGAATTCCCTGATTCCCCTGGAGAAAGCGAAAG-3'
<i>CHS3</i>	5'-CCCAAGCTTGGGCTGGTTGCAAACCCGTTGAC-3'
	5'-CGGGATCCCGACTCTTTTCTTGGCCGGATAGAAC-3'
<i>CHS6</i>	5'-CGGGATCCCGGCTGATTGGAGACCCTTGAGTTGACG-3'
	5'-GGAATTCCATTTTCTTTTGTGGGGGAGAAAAC-3'
<i>TI4</i>	5'-GGAGCAAGAACACTTTATCCACC-3'
	5'-GGCTCAGTATAAGCTTCTATTGACGG-3'
<i>TI5</i>	5'-CCTCTACTTGATATAGCATGAGGAGCATACC-3'
	5'-GGAGCAGTGTCAATGTGGAAGC-3'
<i>ZFP1</i>	5'-CTGCAGTATGGATCACCTAGTATCGC-3'
	5'-GGATCCGGTATAAGAATATGAACAATAAGGGTT-3'
<i>ZFP10</i>	5'-CTGCAGTGTGTGTCAGTGGAGCTATGG-3'
	5'-GGATCCCTGATTGTTTTCTTAATATAGAAAGC-3'
<i>PP01</i>	5'-CCCAAGCTTGGGTCCTCTGGTCTTGAACATCCTAAC-3'
	5'-CGGGATCCCGTACGGTGAGGCTGAAAGTAGGAGAG-3'
<i>hevein</i>	5'-CCCAAGCTTGGGTCACACTCTCATGACACGAATCTC-3'
	5'-CGGGATCCCGTTCCTTAACCCACCTAGGTACTTTTC-3'
<i>CDC2</i>	5'-CAAATGTGCGCTGATGATG-3'
	5'-GATCCATGGGAATGGGTATG-3'
<i>EIF4A-2</i>	5'-CCCAAGCTTGGGCTGACAGCTTGAATGGAACCAATATTG-3'
	5'-GGAATTCCGACTGCAAACAGTAGCCAACAAATAAC-3'

Les séquences en gras sont les sites de restriction ajoutés.

### **1.5.2 Révélation GUS**

Les échantillons ont été filtrés sur des filtres dont la taille des pores est de 25 microns (Whatman, Maidstone, Royaume-Uni) puis incubés avec le filtre dans 1,6 mL de x-glucuronide (BioVectra, Charlottetown, Canada) à une concentration de 0,7859 µg/mL dans un tampon phosphate de sodium (Jefferson *et al.*, 1987). Les filtres imbibés sont incubés à 37°C pendant 24 heures. Les photos des échantillons colorés sur filtre ont été prises à l'aide d'un appareil Nikon Coolpix 4500 à un grossissement de 4,3X. Les photos ont été éclaircies et découpées à l'aide du logiciel Paint.NET (version 3.35), puis assemblées par Adobe Illustrator (version 10.0.3).

## **1.6 PCR QUANTITATIF EN TEMPS RÉEL RTqPCR**

### **1.6.1 Préparation des échantillons**

La souche d'*Agrobacterium* utilisée est AGL1 contenant le plasmide pCAMBIA1381z (Cambia, Brisbane, Australie) sans insert. Les cellules de peuplier 717 ont été infectées par l'*Agrobacterium* à une concentration équivalant à une DO de 0,3. L'expérience a été menée en triplicata biologique. Chaque jour pendant 6 jours (sauf le jour 1), les cellules infectées ont été filtrées puis congelées rapidement dans l'azote liquide et conservées à -80°C. Elles ont été broyées dans l'azote liquide avec un petit mortier. Les extractions d'ARN total ont été faites à l'aide de l'ensemble Qiagen RNeasy plant mini kit (Qiagen, Mississauga ON). Un spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington DE) a été utilisé pour déterminer les concentrations d'ARN. L'intégrité de l'ARN a été vérifiée avant et après le traitement à l'ADNase par électrophorèse sur gel d'agarose. Les ADN complémentaires ont

été synthétisés à partir de 2 µg d'ARN total traité à l'ADNaseI (First Strand cDNA Synthesis Using Superscript II RT, Invitrogen, Carlsbad, CA) selon le protocole donné par le fabricant.

### **1.6.2 Construction des amorces**

Des amorces spécifiques (tableau 3) ont été synthétisées pour chacun des gènes de défense étudiés, amplifiant une partie de la région codante. Ces amorces ont été élaborées à partir d'alignements de séquences d'espèces apparentées au clone 717 de peuplier. Le logiciel OligoAnalyzer V1.2 (<http://www.genelink.com>) a servi au design des amorces. Les amorces ont été testées avec de l'ADN génomique pour s'assurer d'obtenir un produit unique et valider que les amorces étaient spécifiques.

### **1.6.3 Paramètres du RTqPCR**

Chaque réaction de RTqPCR a été réalisée dans un volume total de 10 µL avec 10 ng d'ADNc, 0,6 µM d'amorce sens, 0,6 µM d'amorce anti-sens et 1x de mélange QuantiTech SYBR® Green (Qiagen, Mississauga ON) et complétée sur Stratagene Mx3000P (Stratagene, La Jolla CA). Les paramètres d'amplification étaient: dénaturation initiale à 95°C (15 min), suivie de 45 cycles de dénaturation à 95°C (10 s), hybridation (30 s) et élongation à 65°C (1 min 30 s), puis d'un dernier cycle à 95°C (1 min), 65°C (30 s) et 95°C (30 s). Chaque réaction a été exécutée en duplicata. À la fin de chaque réaction, une triple lecture de la fluorescence a été faite ainsi qu'une courbe de dissociation, permettant de vérifier la spécificité des amorces en plus de l'absence de dimérisation des amorces. En guise de témoins négatifs, des réactions ne contenant pas d'ADN ont été menées. Le seuil de base de la détection de la fluorescence a été fixé à 500 (Livak et Schmittgen, 2001). Les paramètres pour le gain de filtre ont été ajustés à 8x. L'efficacité individuelle des paires d'amorces a été calculée par analyse LRE telle que décrite par Rutledge et Stewart (2008).

**Tableau 3. Amorces utilisées pour la quantification des endogènes par qPCR.**

Nom du gène	Amorce sens
	Amorce anti-sens
<i>MAPK3-1</i>	5'-CCATAAGCACTACCAGTCC-3' 5'-TCAGATACAGAGGAGTGC-3'
<i>VSP</i>	5'-AGCGAGTGCTGCTGTTGCTTTG-3' 5'-ACTTTGACAGAGTTGGCGGTGG-3'
<i>CHS3</i>	5'-GCCTGGGCTTACTGTTGAGAC-3' 5'-CATGGAAGTGGAAATGCACGGTGA-3'
<i>CHS6</i>	5'-TACTGGAGAAGGGCTGGAATGG-3' 5'-CTAGATTGTTGGAGCCACGCTGT-3'
<i>TI4</i>	5'-GGGGATGTTTCGGCGACCAA-3' 5'-GAGCTTGCAGGTGAGAAGGTAAC-3'
<i>TI5</i>	5'-TGAGCTTCTGACAATTGGTGGAGT-3' 5'-CGGTTTCAGTCAAAGCCAGGTATC-3'
<i>ZFP1</i>	5'-GCCTTGAATGATCGAAACCAGGTG-3' 5'-GAAACAATTGACCATAGGAGCTGTCG-3'
<i>ZFP10</i>	5'-GAAAGTGCTGGATCTACTAACACTCG-3' 5'-CAAATCTGGGTGGCATCGAAATACG-3'
<i>PPO1</i>	5'-GAAAATACAGAGTTTGCTGGGAGC-3' 5'-GACCTGGGCACCAAAGC-3'
<i>Hevein</i>	5'-GACGGAGATGGATACGCAAAGG-3' 5'-TCGACGATAGAGAGCAGAGGTTTAG-3'
<i>WRKY23</i>	5'-TGCCATGCCAATGCAAAGGAG-3' 5'-ACCAAACCCAAAGGCGACAAG-3'

### 1.6.4 Normalisation et analyse des données

Des gènes témoins (*cdc2*, *actin*, *ubi10*, *gapdh*, *eif4*; pour les gènes modèles, se référer au tableau 4) ont été choisis afin de valider la qualité et la concentration de chaque échantillon d'ADNc. L'application geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/#download>) a été utilisée pour la normalisation des données (Vandesompele *et al.*, 2002).

**Tableau 4. Amorces des gènes utilisés comme témoins internes lors de la quantification des endogènes par qPCR.**

Nom du gène	Amorce sens
Gène modèle	Amorce anti-sens
Protéine kinase cycline-dépendante 2 <i>CDC2</i>	5'-TGTGCAGCACTCAAGGGCTC-3'
grail3.0056004702	5'-AGGCAACGCAAAGACTGAAGTCT-3'
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	5'-AGGCTTTAGATGATGTGCGAAGTTTGGA-3'
estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X0484	5'-TGGTAGAGGAGAGAGAGCGGGA-3'
Ubiquitine 10	5'-ACCAAGCCCAAGAAGATCAAGCA-3'
estExt_Genewise1_v1.C_LG_II1812	5'-CCAGCACCGCACTCAGCA-3'
Facteur d'initiation de la transcription eucaryote 4A-2	5'-AGAACTACCTCCATCGTATTGGTCGT-3'
estExt_Genewise1_v1.C_LG_VI0160	5'-GCAGCTCCTCAACCGTTACATTATAGA-3'
Actine	5'-CCCATTGAGCACGGTATTGT-3'
estExt_fgenesh4_kg.C_LG_I0082	5'-TACGACCACTGGCATAACAGG-3'

## CHAPITRE 2

### RÉSULTATS

#### 2.1 ANALYSE DES BOÎTES W DANS LES PROMOTEURS DES GÈNES DÉRÉGULÉS DANS LES PLANTS TRANSGÉNIQUES SUREXPRIMANT WRKY23

Les facteurs de transcription WRKY, impliqués dans la réponse de défense, se lient aux boîtes W situées au promoteur des gènes qu'ils régulent. Selon les articles scientifiques, différentes variantes du motif de la boîte W sont employées; pour ces travaux, nous avons utilisé le motif TTGACY (le Y représentant les nucléotides C ou T), puisque les articles les plus récents utilisent majoritairement celui-ci (Ciolkowski *et al.*, 2008; Du et Chen, 2000 ; van Verk *et al.*, 2008 ; Wan *et al.*, 2004). Une étude a démontré que les promoteurs de gènes impliqués dans la défense contiennent en moyenne plus de boîtes W que la fréquence habituellement rencontrée dans le génome (Maleck *et al.*, 2000). Ici, nous avons compté les boîtes W des séquences promotrices des gènes dérégulés par *PtWRKY23* et calculé une moyenne de boîtes W par séquence promotrice. Pour l'ensemble des gènes dérégulés par *PtWRKY23*, le nombre moyen de motifs TGAC rencontrés par séquence promotrice est de 11,18. En comparaison, on retrouve une moyenne de 11,05 motifs TGAC dans les séquences promotrices de gènes non régulés par *PtWRKY23*. Les données étant similaires, on ne peut établir que les séquences promotrices des gènes dérégulés par WRKY23 ont une plus grande quantité de motifs TGAC. Si l'on recherche le motif boîte W TTGACY, la moyenne est de 2,37 pour les gènes dérégulés et de 2,43 pour les gènes non régulés. Que l'on sépare les moyennes pour les gènes surexprimés ou sous-exprimés de l'ensemble des gènes dérégulés, dans tous les cas, on obtient une moyenne d'environ 11 motifs TGAC et 2 motifs TTGACY, ce qui est la même chose pour

les moyennes des gènes non régulés. Les gènes dérégulés par *PtWRKY23* n'ont pas plus de boîtes W dans leurs séquences promotrices que dans celles des gènes non régulés.

**Tableau 5. Moyennes du nombre de boîtes W dans les séquences promotrices des gènes dérégulés dans les plants de peuplier surexprimant *WRKY23*.**

	Moyennes du nombre de boîtes	
	TGAC	TTGACY
Gènes dérégulés	11,18	2,37
Gènes sous-exprimés	11,20	2,42
Gènes surexprimés	11,13	2,25
Gènes non régulés	11,05	2,43

## **2.2 DISPOSITION DES BOÎTES W DANS LES PROMOTEURS CHOISIS CHEZ LES ORTHOLOGUES D'ARABIDOPSIS**

Certains éléments ont été conservés au cours de l'évolution entre différentes espèces végétales et entre membres d'une même famille de gènes. Les boîtes W, par leur rôle dans la régulation de la défense, semblent des candidates idéales pour cette conservation évolutive. Afin de déterminer si l'emplacement de boîtes W est conservé entre membres d'une même famille de gènes, ou entre orthologues, les séquences promotrices de gènes de défense sélectionnés ont été représentées par des lignes noires, et leurs boîtes W ont été situées par des triangles dont la couleur indique s'il s'agit de la boîte W – rouge – ou du motif TGAC – jaune pâle (figure 7).

Les séquences promotrices de gènes d'entretien (*housekeeping*) sont également représentées à titre comparatif.

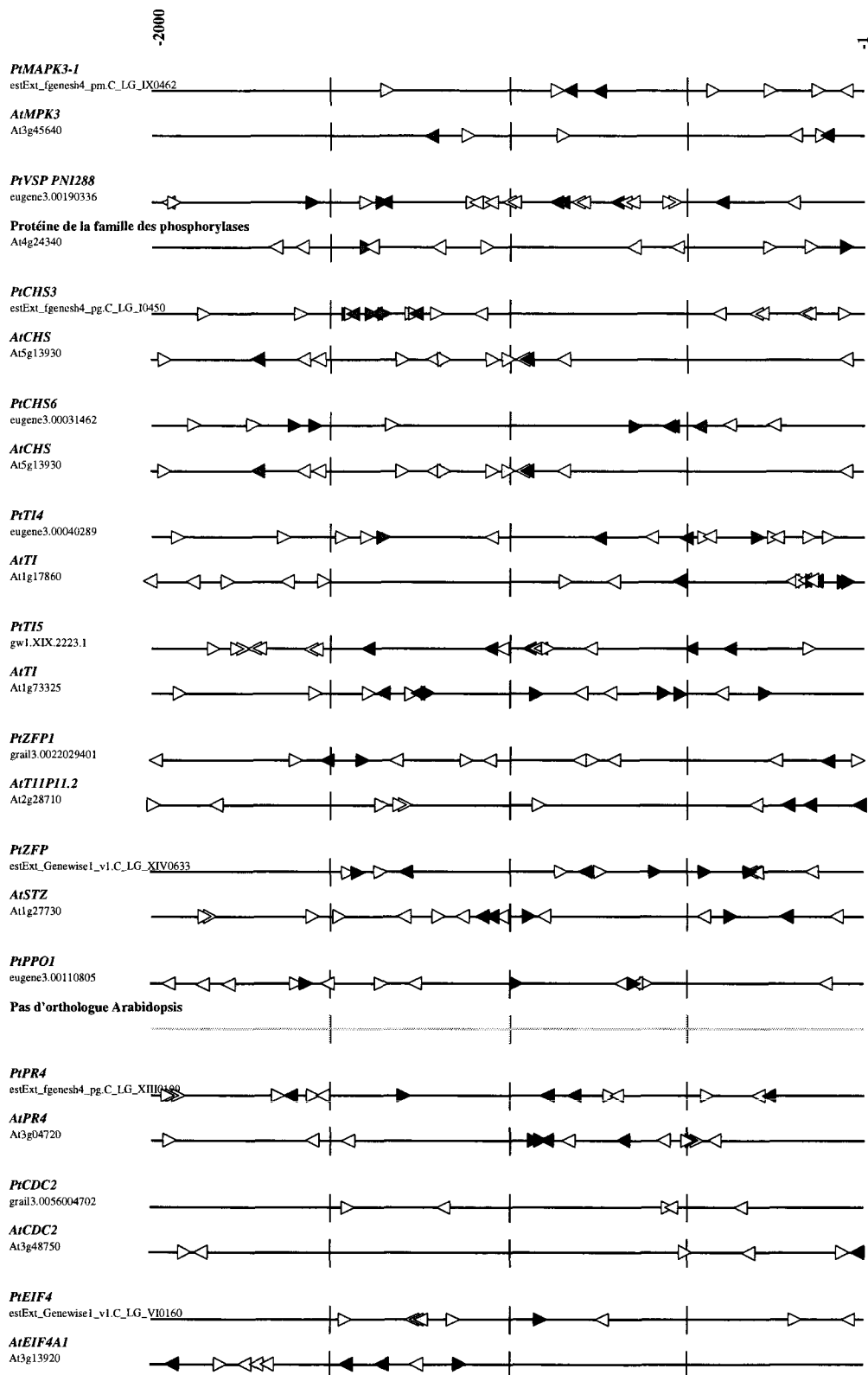
Une dizaine de gènes reliés à la défense ont été sélectionnés afin que leurs séquences promotrices soient étudiées en détail. Le critère de sélection était d'être reconnu comme étant lié à la réponse de défense. Certains d'entre eux sont fortement dérégulés dans les plants de peuplier surexprimant *PtWRKY23*. Le gène *pseudo-hevein PR4* est utilisé comme marqueur de la réponse de défense (Odintsova *et al.*, 2009) et celui de la polyphénol oxydase *PPO1* comme marqueur de la blessure (Pinto *et al.*, 2008). Également, deux gènes d'entretien ont été sélectionnés en guise de témoins non reliés à la défense. De manière générale, tous les gènes impliqués dans la défense sélectionnés ici ont deux boîtes W ou plus, ce qui correspond ou est supérieur à la moyenne par séquence promotrice, sauf pour *PtWRKY23*, qui n'en contient aucune. Les emplacements des boîtes W ne sont pas communs entre les orthologues, ni entre membres d'une même famille pour une même plante (figure 7). Les facteurs de transcription WRKY ne semblent avoir aucune préférence pour l'orientation de la boîte W (Ciolkowski *et al.*, 2008).

La MAP kinase 3-1 (MAPK3-1) a un rôle primordial dans la défense. C'est l'une des protéines majeures impliquées dans la cascade de signalisation par les kinases, qui viennent induire ou activer les facteurs de transcription WRKY (Kim et Zhang, 2004; Menke *et al.*, 2005). Chez le peuplier, une MAPK du même poids moléculaire que *PtMAPK3-1* est activée moins de 5 minutes après un traitement au chitosane (Hamel *et al.*, 2005). Rappelons ici que *PtWRKY23* a été isolé d'une banque d'ADNc fabriquée en partie de tissus traités au chitosane. Pour ces différentes raisons, *MAPK3-1*, probablement associé à la réponse précoce de défense, semblait être un bon candidat dans notre sélection de séquences promotrices. Il a été démontré que les gènes de la famille des protéines végétatives d'entreposage (*VSP*) sont reliés à la défense contre les herbivores et à la blessure. Le gène *AtVSP2* est induit par la blessure (Liu *et al.*, 2005). Le litchi a une protéine VSP qui a une action inhibitrice de la trypsine (Tian *et al.*, 2007). Il a été également démontré que les protéines VSP font partie de la réponse locale à la blessure causée par l'herbivore chez *Arabidopsis* (Berger *et al.*, 2002). Il y a 21,3 fois de



transcrits de *VSP PNI288* dans les feuilles de plants de peuplier surexprimant *WRKY23* que dans des plants de type sauvage (Levée *et al.*, 2009). Fait intéressant, dans des plants sauvages affectés par la rouille du peuplier, il y a 8,3 fois moins de transcrits *VSP PNI288* que dans des plants sauvages non infectés (Levée *et al.*, 2009). Dans la séquence de 2 000 paires de bases (pb) en amont du codon de départ de la traduction, on y recense pas moins de 23 motifs TGAC qui sont souvent regroupées en petits sous-groupes de 2 à 6 motifs (figure 7). La séquence promotrice de *VSP PNI288* de peuplier contient deux fois plus de motifs TGAC que son orthologue chez *Arabidopsis*, et plus de trois fois le nombre de boîtes W. Parmi les gènes les plus hautement dérégulés dans les plants surexprimeurs de *WRKY23*, *VSP PNI288* a été sélectionné pour le groupe de séquences promotrices à analyser. Quatre représentants de la famille des chalcone synthases (*CHS*), impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes, y sont illustrés. La séquence promotrice du gène de peuplier *PtCHS3* contient une importante concentration de motifs TGAC entre -1500 et -1000; 11 motifs y sont regroupés dont 6 boîtes W. Aucune séquence de *CHS* étudiée ici ne rassemble autant de boîtes W pour un même intervalle. Différents gènes *CHS* ont été choisis pour vérifier si l'emplacement des boîtes W est constant pour une famille: ce n'est pas ce qui arrive pour les séquences promotrices étudiées ici. Au sein d'une même famille, les gènes peuvent suivre des voies de régulation différentes; ça semble être le cas des inhibiteurs de trypsine de la famille des Kunitz (*TI*). Dans des plants de peuplier infectés par la rouille, le taux de transcrits de *TI4* est 6 fois plus élevé par rapport à des plants non infectés, alors qu'à l'inverse, le taux de transcrits de *TI5* est 10 fois plus faible. Au niveau de la structure des séquences promotrices, on ne retrouve aucun assemblage de boîtes W commun. Ces gènes ont été sélectionnés pour leur implication potentielle dans la réponse de défense à la rouille, puisque *PtWRKY23* semble lui aussi y être impliqué. Les protéines à doigt de zinc ZFP sont une autre famille de facteurs de transcription impliqués dans la réponse de défense. Les deux gènes sélectionnés de cette famille ainsi que leurs orthologues respectifs ont plusieurs boîtes W sur leurs séquences promotrices, mais sans regroupement de boîtes W ou d'autres structures particulières. La séquence promotrice de *PtZFP10* renferme plus de boîtes W que celle de *PtZFP1*. Pourtant, *PtZFP1* est l'un des gènes dérégulés dans la catégorie des facteurs de transcription dans les peupliers surexprimeurs de *PtWRKY23* (Levée *et al.*, 2009). Un bon marqueur de la réponse à la blessure est le gène

*PPO1*. Il n'a pas d'orthologue chez l'Arabidopsis. Chez le peuplier, l'activité enzymatique des PPO augmente drastiquement après blessure (Constabel *et al.*, 2000). Le gène *hevein* fait partie du groupe 4 des protéines reliées à la défense (PR). L'orthologue d'Arabidopsis contient une boîte W de plus que chez le peuplier. De plus, une grande concentration de boîtes W et de motifs TGAC se retrouvent entre – 1 000 et – 400 dans la séquence *AtPR4*. *Pthevein* est utilisé comme marqueur de la réponse de défense, puisqu'il y a accumulation de transcrits après traitements tels le chitosane, le peroxyde ou la blessure (Levéé *et al.*, 2009). Le gène *PtCDC2*, servant à la division cellulaire, sert ici de témoin puisqu'il n'est pas impliqué dans les réactions de défense. Il est utilisé à notre laboratoire pour normaliser les données obtenues par quantification de l'ADNc (Azaiez *et al.*, 2009; Levée *et al.*, 2009; Nicole *et al.*, 2006). Sa séquence promotrice contient tout de même 5 motifs TGAC. Il n'y a pas de moyen *in silico* de différencier un motif TGAC qui a la fonction d'une boîte W et la probabilité d'obtenir une séquence TGAC n'importe où dans le génome. De plus, certains WRKY sont impliqués dans d'autres mécanismes que la défense, par exemple dans différents processus du développement (Qiu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Le gène *AtEIF4A1*, choisi lui aussi comme gène témoin non impliqué dans la défense, contient 4 boîtes W. Ceci peut être dû au fait que les promoteurs d'Arabidopsis sont considérés habituellement plus petits que 2 000 paires de bases (pb), la plupart des études sur les promoteurs se basent sur des séquences entre 1 et 1,5 kilobases (kb) (Ciolkowski *et al.*, 2008; Hellens *et al.*, 2005; Lawrence *et al.*, 2006; Ma et Bohnert, 2007; Maleck *et al.*, 2000).



**Figure 7. Disposition des boîtes W sur une sélection de séquences promotrices de 2000 paires de bases (pb).**

La séquence promotrice est représentée par une ligne horizontale noire, avec une marque à toutes les 500 pb. Le gène modèle est inscrit sous le nom de chaque gène. Les boîtes W sont représentées par les triangles rouges, les séquences TGAC, par les triangles jaune pâle. Ceux pointant vers le -1 (symbolisant l'ATG) sont en sens, ceux pointant vers le -2000 en antisens.

### **2.3 ANALYSE FONCTIONNELLE DES PROMOTEURS PAR EXPRESSION TRANSITOIRE DANS DES CELLULES DE PEUPLIER**

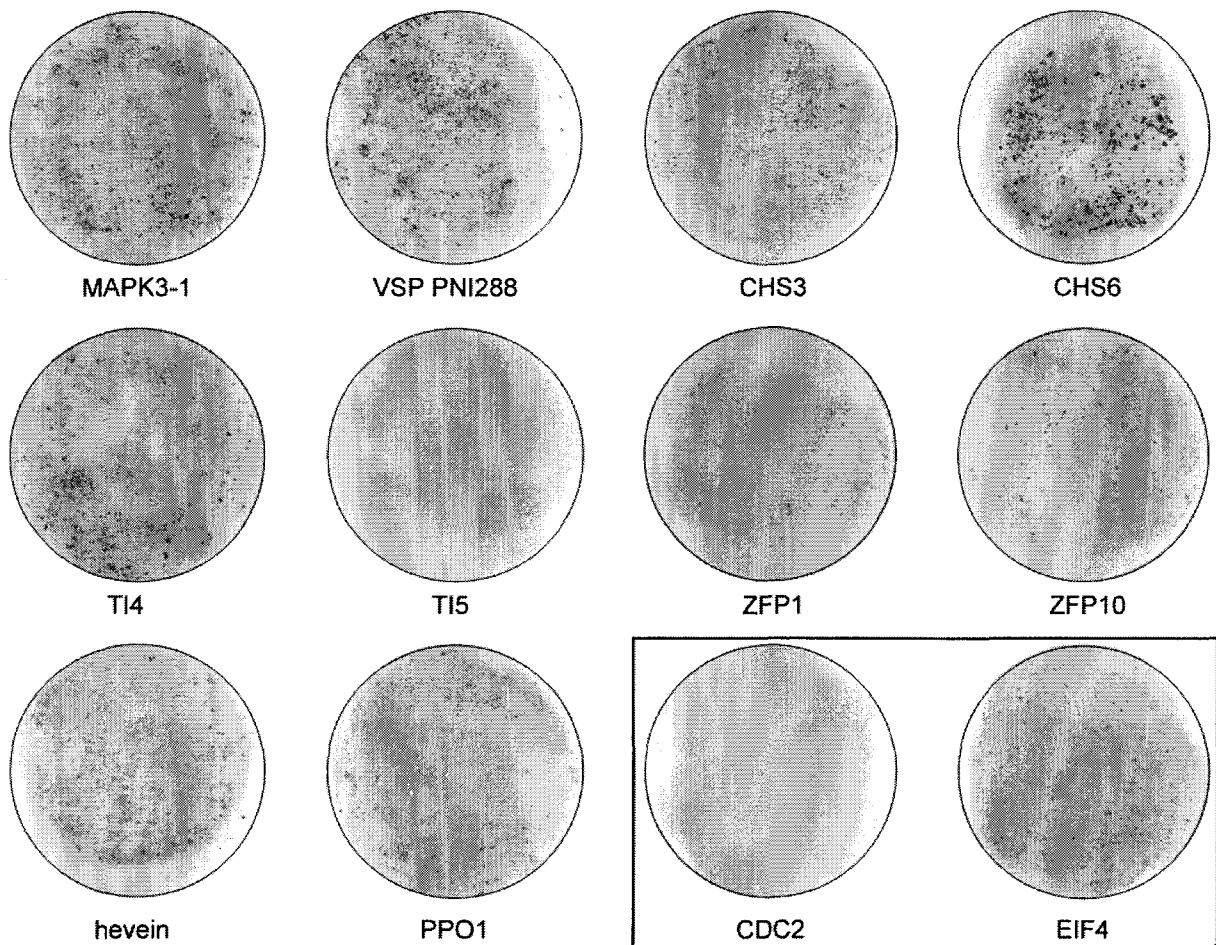
Le promoteur porte le site d'initiation de la transcription. Les éléments cis situés sur la séquence promotrice permettent quant à eux de moduler la transcription. Un promoteur dit fort lance la synthèse d'un grand nombre d'ARNm qui seront éventuellement traduits en protéines, alors que le gène d'un promoteur dit faible ne produira que peu d'ARNm. Au-delà de la force du promoteur et l'accumulation de transcrits qui en résulte, la stabilité de l'ARN, l'épissage génétique et l'interférence de l'ARN viennent eux aussi influencer la quantité d'ARNm produite. L'insertion d'un promoteur couplé à un gène rapporteur dans des cellules permettra d'évaluer la force dudit promoteur. Ici, une sélection de promoteurs reliés à la défense ont été associés au gène de la  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*), résultant en différentes intensités de coloration bleue, ce qui démontre différents niveaux d'accumulation de la protéine selon le promoteur associé (figure 8). Dans ce système d'agro-infection de cellules en suspension, les promoteurs sont reconnus par la machinerie cellulaire et conservent leurs propriétés en grande partie (Berger *et al.*, 2007). Nos résultats démontrent que les cellules transformées avec les séquences promotrices des gènes témoins ont aussi des intensités contrastantes: les cellules *EIF4::GUS* sont fortement colorées, alors qu'à peine quelques cellules *CDC2::GUS* sont bleues. D'ailleurs, au moment de l'infection, le taux de transcrits de *EIF4* est 3 fois plus élevé que celui de *CDC2* (figure 8). Les promoteurs peuvent avoir des forces différentes même pour des gènes d'une même famille, ce qui est bien visible pour les cellules *CHS3::GUS* et

*CHS6::GUS*, ainsi que *TI4::GUS* et *TI5::GUS*. L'effet est beaucoup moins marqué chez les cellules infectées avec des promoteurs de la famille *ZFP*.

## **2.4 ÉTUDE DE L'ACCUMULATION DE TRANSCRITS POUR LES GÈNES CANDIDATS CHOISIS**

L'expression des gènes de défense sélectionnés a été quantifiée par RTqPCR, choisie pour sa sensibilité et sa sélectivité (Higuchi *et al.*, 1993). Par cette méthode il est possible de quantifier des transcrits de gènes dont les séquences sont très similaires, comme des gènes d'une même famille (Nicole *et al.*, 2006). Les échantillons utilisés proviennent de cellules en suspension infectées ou non par l'*Agrobacterium* afin de déterminer si l'étape de transformation a un effet sur l'expression des gènes candidats.

Afin de s'assurer que l'hybridation des amorces est spécifique, les paires d'amorces ont été testées sur de l'ADN génomique provenant des espèces parentales, soit *P. tremula* et *P. alba*, et un gradient de température a été fait pour déterminer la température optimale de chaque paire d'amorces. Chaque valeur d'accumulation de transcrits pour un gène spécifique représente la moyenne géométrique de six réactions PCR indépendantes: deux réplicats techniques pour chacun des trois réplicats biologiques. Les valeurs d'accumulation de transcrits du jour 0 sont ramenées à 1, et les valeurs d'accumulation des autres jours sont calculées en fonction du jour 0. Les courbes de la figure 9 sont celles des données de  $\Delta\Delta Ct$ . Un seuil de signification a été posé: seuls les ratios de différence d'expression supérieurs à 2 et inférieurs à 0,5 sont considérés comme significatifs, c'est-à-dire que l'expression du gène a changé de manière notable depuis le jour zéro.



**Figure 8. Cellules de peuplier infectées par l'*Agrobacterium* contenant un vecteur *promoteur::GUS*, incubées dans une solution de x-glucuronide.**

Le nom sous chaque filtre représente le gène de la séquence promotrice incluse dans le vecteur. Dans l'encadré, cellules infectées qui sont considérées comme témoins puisque les promoteurs utilisés ne sont pas en lien avec les mécanismes de défense.

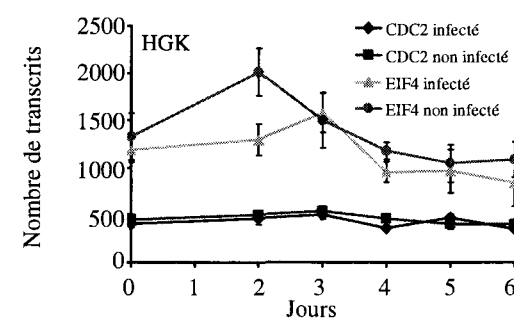
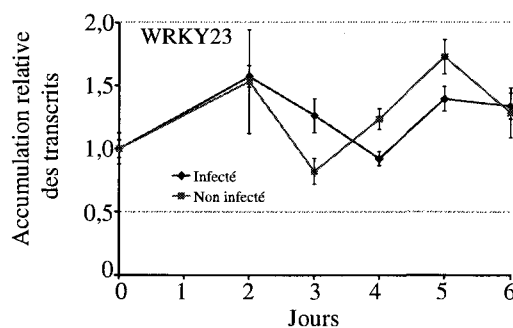
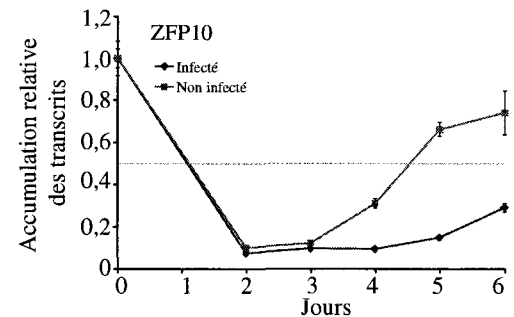
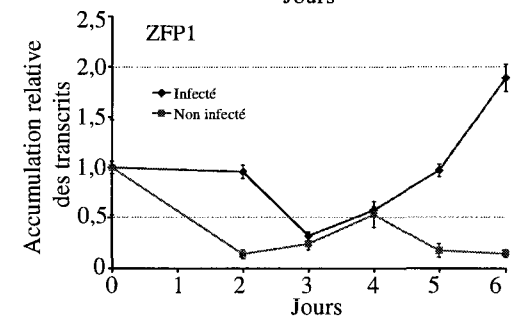
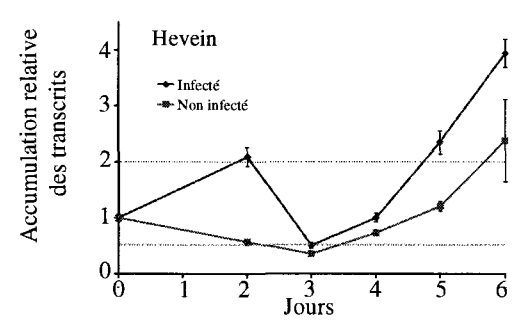
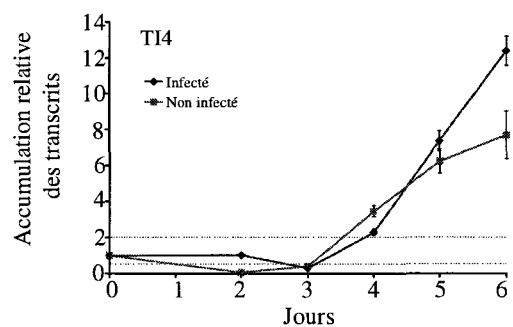
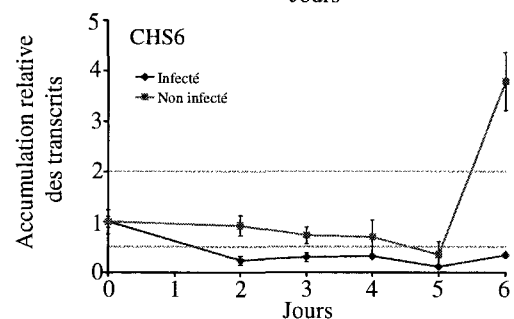
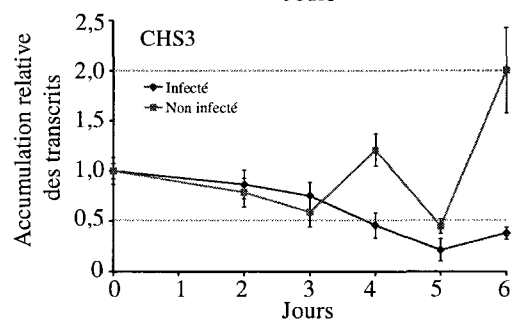
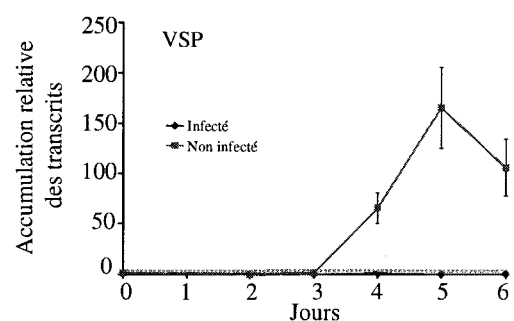
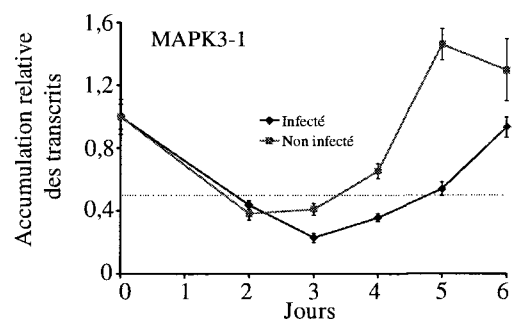
Cinq témoins internes qui démontrent une expression constante ont été quantifiés pour uniformiser les niveaux de transcrits d'un échantillon à l'autre: ce sont les gènes codant pour la protéine kinase cycline-dépendante 2 (*CDC2*), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, l'ubiquitine 10, le facteur d'initiation de la transcription eucaryote 4A-2 (*EIF4*) et l'actine 2 (figures 9 et 10). Ils ont tous démontré un niveau d'expression relativement constant du début à la fin de la cinétique. Comme ce sont des gènes reliés au cycle cellulaire, à la division cellulaire et à la maintenance de la cellule, le nombre de transcrits décroît vers la fin de la cinétique étudiée (résultats non montrés). Les cellules en suspension sont repiquées aux 7 jours et lorsqu'on tend vers le septième jour, les conditions de croissance sont moins optimales, la disponibilité des nutriments diminue, la division cellulaire ralentit, le taux de mortalité augmente et le nombre de débris cellulaires aussi. La santé générale des cellules diminue, ce qui explique pourquoi le nombre de transcrits des gènes de maintenance diminue également. Le nombre de transcrits de *CDC2* et *EIF4* sont représentés à la figure 9. Le nombre de transcrits de *CDC2* reste relativement stable durant les 6 jours de la cinétique, alors que le nombre de transcrits de *EIF4* diminue progressivement après avoir atteint un sommet à 2 ou 3 jours. La raison pour laquelle le pic du nombre de transcrits ne se situe pas la même journée pour les échantillons infectés et non infectés est peut-être simplement que les cultures ne sont pas tout à fait synchronisées dans leur croissance cellulaire.

*MAPK3-1* serait fort probablement un bon candidat de gène de réponse précoce de la défense. Du côté de son orthologue chez l'*Arabidopsis*, *AtMAPK3*, la quantité d'ARNm augmente significativement et en moins de 5 heures en réponse au toucher, au froid ou à un stress salin (Mizoguchi *et al.*, 1996). Pour les deux types d'échantillons, entre deux à quatre jours après le repiquage (et l'infection pour l'échantillon infecté), on retrouve environ deux fois moins de transcrits qu'au jour zéro. Tous les échantillons suivent à peu près la même cinétique, les échantillons non infectés ayant tout de même un nombre plus élevé de transcrits que ceux infectés. L'effet d'*Agrobacterium* est peu visible sur cette cinétique de croissance. Cela pourrait signifier que cette bactérie n'active pas les voies de défense contrôlées par PtMAPK3-

1. Selon la littérature, l'activation de AtMAPK3 se produit très rapidement après la perception du stress (Droillard *et al.*, 2002); il est possible que pour *PtMAPK3-1*, son effet ici n'est pas observable à cause de la distance prise entre les deux premiers échantillons (zéro et deux jours).

VSP a un rôle dans les processus d'entreposage, mais il a été observé que le taux de transcription augmente lorsque la plante est blessée (Berger *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005) . Dans le contexte étudié ici, l'ajout d'*Agrobacterium* à la culture cellulaire semble complètement réprimer la transcription de *VSP*. Du côté du témoin non infecté, la transcription de *VSP* est inhibée à partir du repiquage, puis l'accumulation de transcrits augmente à partir du jour 3, pour atteindre un pic à 5 jours de 165 fois plus de transcrits que dans l'échantillon du jour 0. Plus on avance dans le cycle de croissance, plus *VSP* s'accumule. Au jour 6, on s'approche de la fin du cycle, il est possible qu'on atteigne un plateau ou un ralentissement de la croissance et de la vitalité des cellules, d'où la baisse de l'accumulation relative de transcrits de *VSP*. Il est étonnant qu'il n'y ait que peu ou pas de transcription de *VSP* dans les échantillons infectés; on pouvait s'attendre à ce qu'il y en ait une, selon ce qui est rapporté dans la littérature. On suppose alors que l'*Agrobacterium* vient inhiber la voie de réponse de défense dans laquelle la protéine VSP est impliquée.

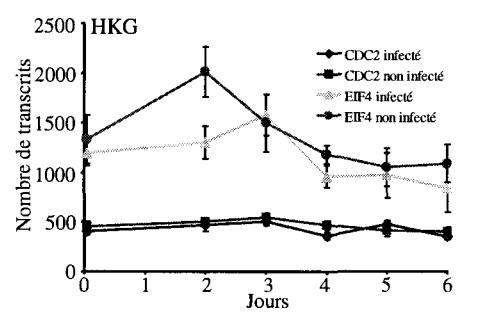
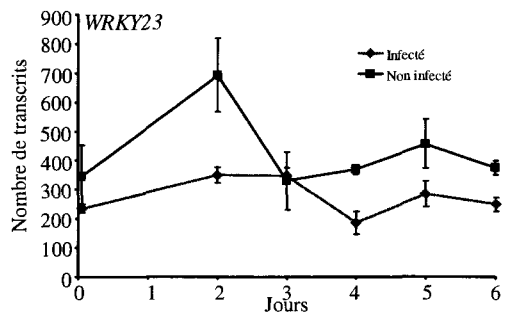
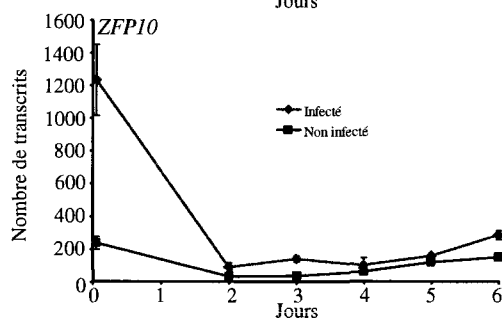
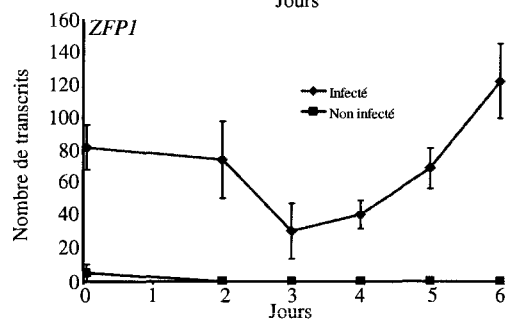
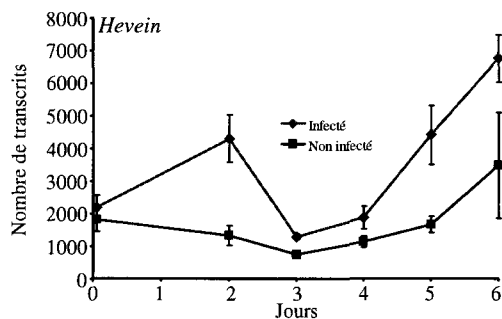
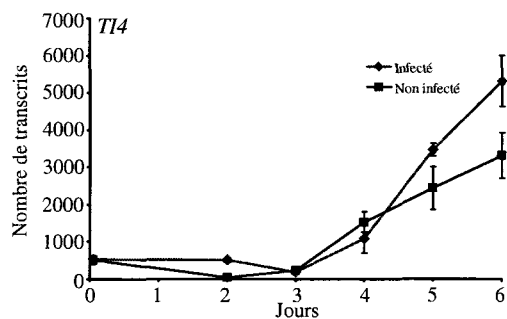
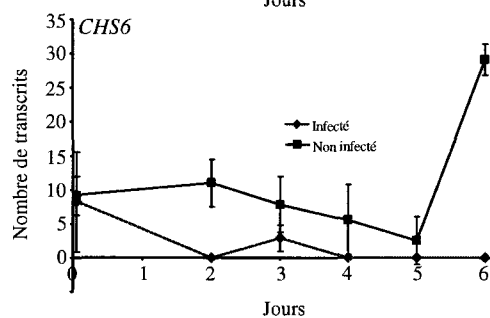
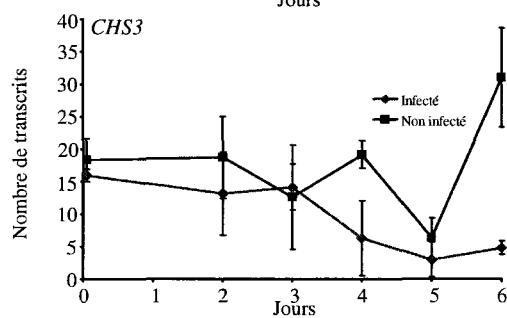
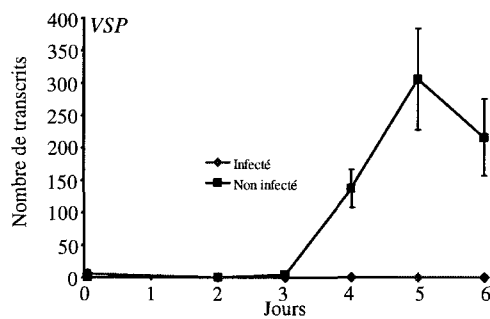
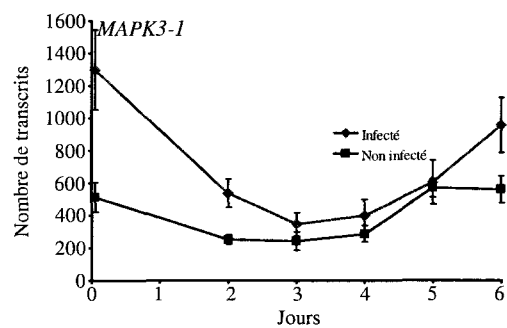




**Figure 9. Différences d'expression de gènes de défense entre les cellules infectées par l'*Agrobacterium* et celles témoin, par rapport au jour zéro.**

Chaque échantillon a été fait avec trois réplicats biologiques et ceux-ci ont été faits avec deux réplicats techniques pour la quantification par PCR. Le graphique tout en bas à droite représente les nombres de transcrits de deux des gènes utilisés comme témoins internes, *CDC2* et *EIF4*. Des seuils de signification ont été posés à 0,5 et 2, ils sont soulignés ici par une ligne pointillée grise.

Des gènes d'une même famille peuvent avoir des patrons d'accumulation relative de transcrits différents, comme c'est le cas pour les gènes *CHS3* et *CHS6*. Le niveau d'accumulation relative de *CHS3* diminue de 2 à 5 fois à partir du quatrième jour après l'infection, pour les échantillons infectés par *Agrobacterium*. L'effet négatif par *Agrobacterium* sur l'accumulation de transcrits pour le gène *CHS6* dans les échantillons infectés s'effectue à partir du deuxième jour après l'infection. Au sixième jour post-infection, l'accumulation de *CHS3* et *CHS6* augmente drastiquement dans les échantillons non infectés, jusqu'à 3,8 fois pour *CHS6*, pour une raison méconnue. L'une des raisons pouvant expliquer ce changement serait que dans les échantillons non infectés, la croissance cellulaire continue de manière exponentielle, et à six jours la culture atteint la fin de sa phase exponentielle, le taux de mortalité augmente, la santé générale de la culture diminue, et conséquemment les taux de transcription des gènes de défense augmentent. Par contre, comme cet effet a lieu chez les cellules non-infectées plutôt que dans celles infectées, et ce, pour les deux gènes CHS, il est suggéré que l'ajout de l'agrobactérie y a forcément un lien. Il se pourrait que l'infection par l'*Agrobacterium* vienne supprimer certaines des réponses tardives de la défense des végétaux.



**Figure 10. Nombre de transcrits pour chaque endogène étudié, chez un système infecté par l'*Agrobacterium* et un système sans infection.**

Chaque échantillon a trois réplicats biologiques. Pour chacun d'eux, la réaction de qPCR a été répétée deux fois.

*TI4* est réprimé dans les échantillons non infectés à 2 jours, alors qu'il n'y a pas de variation significative dans les échantillons infectés. Le nombre de transcrits augmente à partir du jour 4, vers la fin du cycle de croissance (figure 9). Pour ce gène, les cellules infectées et non infectées suivent grossièrement la même cinétique du nombre de transcrits en fonction du nombre de jours après infection (figure 10). Les réactions de RTqPCR ont été faites pour le gène *TI5*. Il est peu ou pas exprimé dans le système étudié ici, que les échantillons soient infectés ou non; les graphiques correspondant à *TI5* ne sont donc pas présentés dans ce travail. L'absence de ou la très faible transcription de *TI5* correspond à ce qui a été observé lors des expériences de transformation transitoire avec sa séquence promotrice fusionnée au gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*): une quantité infime de cellules se sont colorées qu'après plusieurs jours de co-culture avec *Agrobacterium* (figure 8). D'ailleurs, *TI4* ayant une accumulation de l'ordre de 500 à plus de 5 000 transcrits, semble lui aussi corrélérer avec les expériences de transformation transitoire, où une grande partie des cellules se sont colorées, comparativement aux expériences avec *TI5*. Le gène *Hevein* est également affecté par la présence d'*Agrobacterium*. L'accumulation relative de transcrits d'*Hevein* augmente de 3,7 fois deux jours après l'infection, comparativement à l'échantillon non infecté du même jour. L'accumulation de transcrits d'*Hevein* est deux fois plus élevée qu'au jour zéro, pour les échantillons infectés. *Hevein* participerait donc aux réponses de défense enclenchées par *Agrobacterium* pour ce système de cellules en suspension. L'accumulation relative des transcrits par rapport au jour zéro pour les échantillons non infectés de *ZFP1* est toujours en dessous du seuil fixé de 0,5. L'écart-type pour le jour zéro des échantillons non infectés est très élevé puisque *ZFP1* a subi une augmentation du nombre de transcrits peu après l'infection. En tenant compte de ceci, il est possible de recalculer les taux de transcrits pour tous les échantillons non infectés et de n'obtenir que des taux se rapprochant de 1, signifiant

que l'accumulation relative des transcrits pour *ZFP1* non infecté est pratiquement inchangée. L'écart entre le taux de transcrits de *ZFP1* pour les échantillons infectés versus non infectés se creuse aux cinquième et sixième jours de la cinétique. En fait, dans les échantillons non infectés, il n'y a que peu ou pas d'expression de *ZFP1*. Dans les échantillons infectés, la transcription débute rapidement après l'infection et *ZFP1* continue à être exprimé tout au long des 6 jours sur lesquels s'est déroulé le suivi. Ce gène est fortement exprimé pendant les 48 premières heures post-infection, ensuite le nombre de transcrits diminue, puis augmente progressivement dans la dernière partie de la cinétique. Les divers changements dans l'accumulation des transcrits donne l'impression qu'il y a superposition de deux phénomènes différents: l'effet de l'agrobactérie et autre chose. L'atteinte de la fin de la croissance exponentielle ne semble pas être la ou l'une des causes de l'augmentation de l'accumulation de transcrits puisque le témoin non infecté, dont les cellules proviennent de la même culture et ont donc le même âge, n'est pas marqué par l'accumulation de *ZFP1*. La cinétique de *ZFP10* est complètement différente de celle de *ZFP1*. Le nombre de transcrits a augmenté 20 minutes après l'infection, puis diminue au jour 2 (figure 10). Les deux traitements ont à peu près le même impact pour les jours suivants. L'*Agrobacterium* a donc un effet sur ce facteur de transcription puisqu'il provoque l'augmentation de l'accumulation de transcrits jusqu'à 48 heures après infection. L'accumulation relative des transcrits de *WRKY23* oscille entre 0,8 et 1,7 par rapport au jour zéro durant les six jours de la cinétique, dans les deux types d'échantillons. Dans les échantillons infectés, le nombre de transcrits diminue peu de temps après l'infection. L'effet inhibiteur d'*Agrobacterium* est plus visible à 48 heures post-infection, alors que le nombre de transcrits de *PtWRKY23* est plus du double dans les échantillons non-infectés que ceux infectés. L'infection par l'*Agrobacterium* aurait alors un effet inhibiteur sur l'expression du gène qui commencerait peu après l'infection, et qui atteindrait son apogée entre un et trois jours suivant la co-culture. Il n'a pas été possible de quantifier l'endogène *PPO1* du clone de peuplier 717. Il n'y a pas de séquence nucléique disponible pour permettre la construction d'amorces correspondant à ce clone, en plus que l'annotation du génome séquencé n'est pas complète.

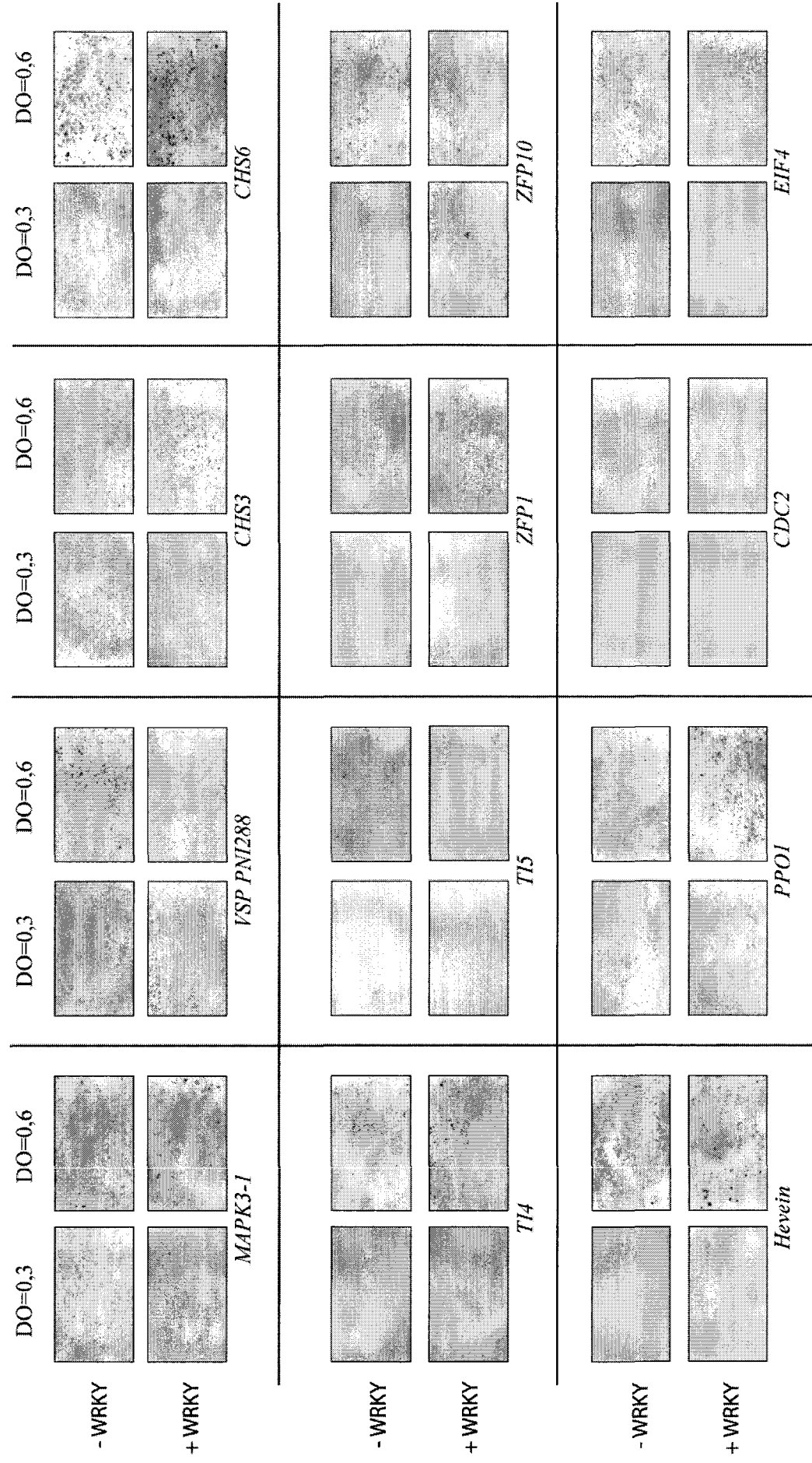
Dans les gènes étudiés ici, certains d'entre eux sont dérégulés par la présence d'*Agrobacterium*: *TI4*, *VSP* et *Hevein*, qui présentent tous une forte diminution ou augmentation des transcrits dans l'échantillon pris deux jours après l'infection. De plus, on perçoit une augmentation du nombre de transcrits codant pour les facteurs de transcription *ZFP1* et *ZFP10* quelques minutes après la mise en contact avec l'agrobactérie. Finalement, l'*Agrobacterium* semble aussi avoir un effet inhibiteur sur l'expression du gène *PtWRKY23*.

## 2.4 ESSAIS DE CO-TRANSFORMATION AVEC LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION WRKY23

On a voulu vérifier l'effet de l'augmentation de la protéine recombinante *PtWRKY23* sur l'expression du rapporteur *GUS*, en aval des régions promotrices étudiées ici. Au moment de l'infection avec *Agrobacterium* contenant les constructions promoteur::*GUS*, une deuxième construction a été co-transformée, celle-ci portant le gène *PtWRKY23* en aval d'un promoteur constitutif fort. Deux quantités d'inocula différentes d'*Agrobacterium* ont été essayées; règle générale, une quantité d'inoculum plus élevée donne plus de cellules bleues (figure 11). Pour les essais qui ont une forte coloration bleue avec la quantité d'inoculum moins élevée, le contraste est de moindre importance entre les deux quantités d'inoculum. On semble obtenir une saturation de l'accumulation de GUS pour ces échantillons. Pour les deux gènes témoins, *CDC2* et *EIF4*, l'ajout du gène *PtWRKY23* ne semble avoir aucun effet sur l'accumulation du rapporteur GUS. Sauf pour la région promotrice de *CHS3*, on ne note pas de différence entre les échantillons qui ont subi ou non l'ajout de *PtWRKY23*. Les échantillons qui affichent une coloration bleue restent bleus à l'ajout de *PtWRKY23*, les échantillons qui n'ont peu ou pas de bleu restent non colorés (figure 11). Lorsque l'*Agrobacterium* est ajouté à une DO de 0,3 aux cellules également infectées par une souche porteuse de la construction *CHS3*::*GUS*, la coloration bleue diminue considérablement.

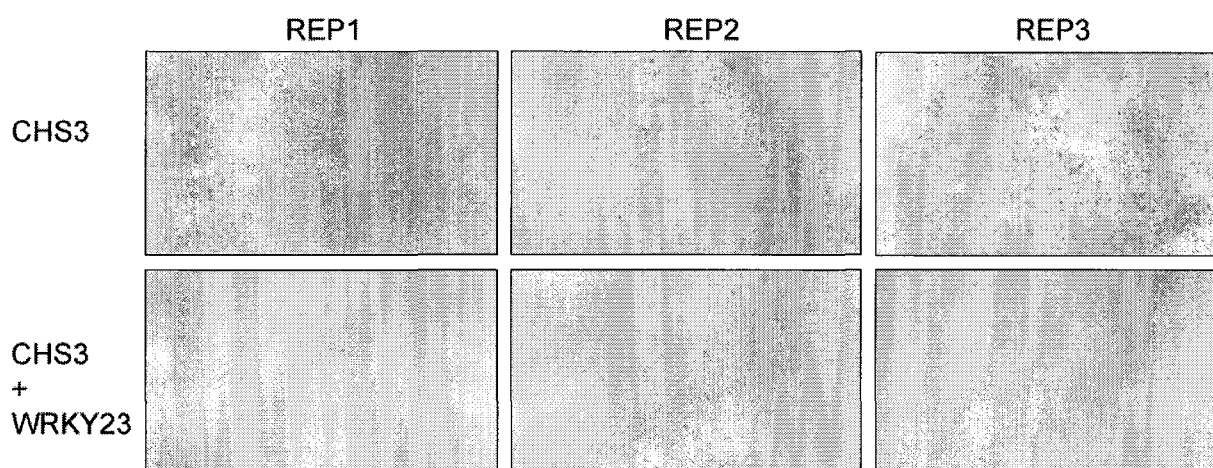
Pour trois des régions promotrices étudiées, les résultats de chacun des triplicatas sont présentés (figures 12 à 14). À une DO d'infection de 0,3, tous les réplicats de *CHS3* accusent

une diminution de la coloration bleue, indiquant que l'accumulation de la protéine GUS diminue lorsque les cellules sont également infectées par la souche qui contient *UBI::PtWRKY23* (figure 12). Ce phénomène n'est pas visible lorsque la DO d'infection est à 0,6. Les cellules infectées à une DO de 0,3 par l'*Agrobacterium* contenant la construction *hevein::GUS* sont légèrement colorées (figure 13). L'ajout ou non de la construction *PtWKY23* ne semble d'aucun effet (sauf pour l'un des réplicats). À une DO d'infection de 0,6, on remarque qu'il y a fort moins de cellules qu'à une DO de 0,3: il y a mortalité cellulaire. Les cellules transformées avec la région promotrice de *VSP PNI288* sont fortement colorées à une DO d'infection de 0,3 (figure 14). La différence avec la DO d'infection de 0,6 est moins notable que pour les cellules transformées avec les autres régions promotrices étudiées, possiblement parce que l'accumulation ou la vitesse d'accumulation de GUS est saturée dans ce cas spécifique. Il est possible que la quantité de bactéries des co-cultures à une DO d'infection de 0,6 est trop élevée de manière générale, et que peu importe le gène de facteur de transcription utilisé et les séquences promotrices étudiées, l'excès de bactéries, la force ou la vitesse d'infection cause la MCP. Il serait alors moins pertinent d'analyser les résultats obtenus à cette concentration de bactéries. Cependant, pour certaines des séquences promotrices étudiées, le contraste est très grand entre les deux DO employées, ce qui permet d'étudier mieux certains échantillons peu colorés en plus qu'au final cela fournit plus d'échantillons pour déterminer s'il y a interaction ou non.

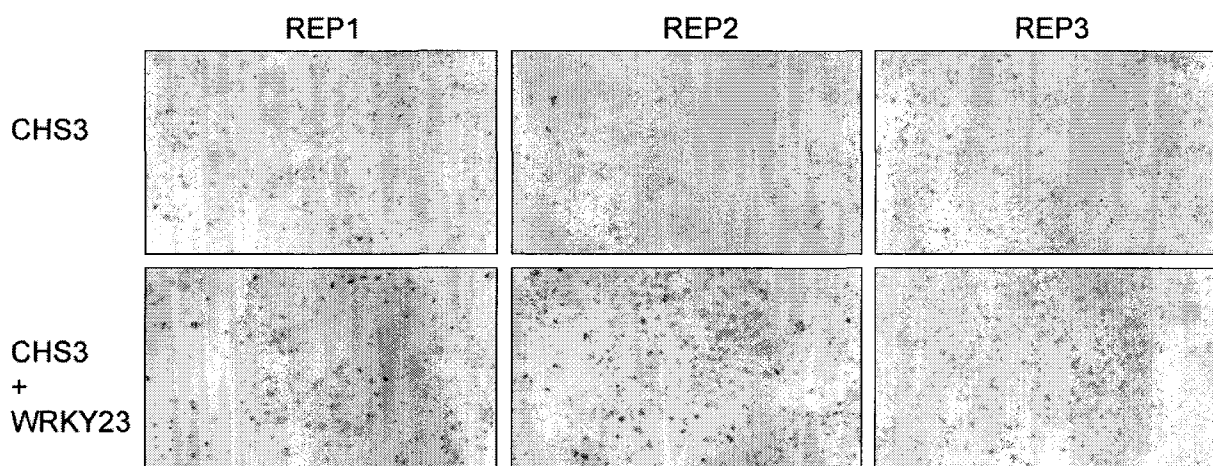


**Figure 11. Co-transformation de cellules de peuplier par deux types d'*Agrobacterium*, l'un contenant un vecteur promoteur::GUS, l'autre la séquence codant pour WRKY23 ou un vecteur vide comme témoin négatif.**  
 Les densités optiques (DO) réfèrent à la quantité totale de bactéries.





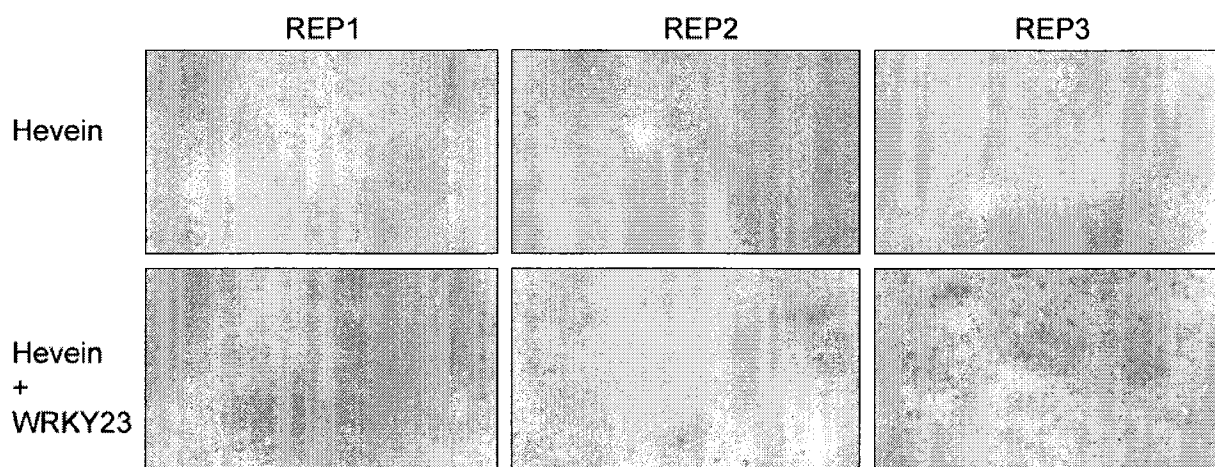
DO = 0,3  
6 jours d'incubation



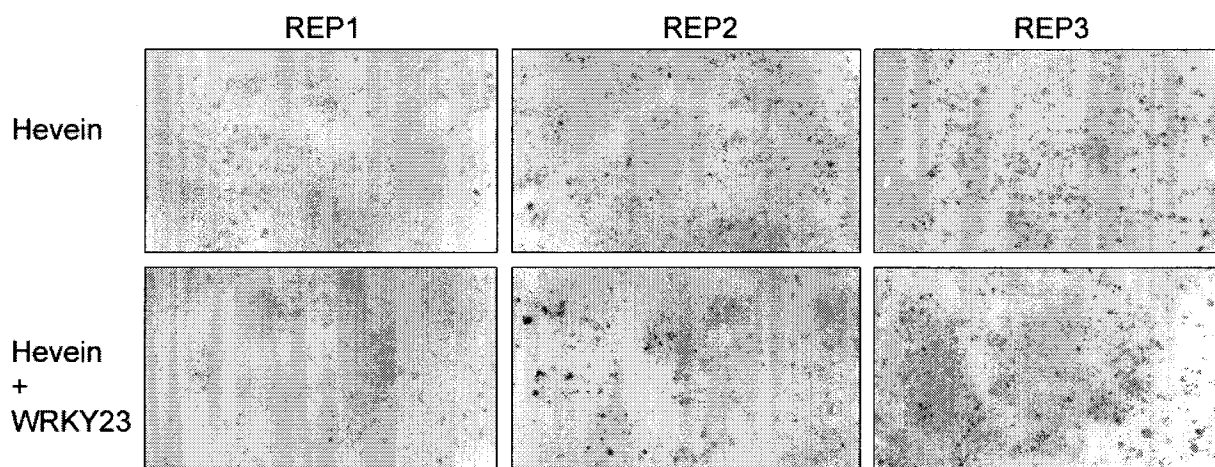
DO = 0,6  
6 jours d'incubation

**Figure 12. Cellules de peuplier infectées par l'*Agrobacterium* contenant un vecteur *CHS3::GUS* et un autre contenant le gène *WRKY23* ou un vecteur vide.**

Les DO réfèrent à la quantité totale de bactéries dans un échantillon. Chaque expérience a été faite en triplicata (indiqué par REP1, 2, 3). La révélation dans la solution de x-glucuronide a eu lieu après 6 jours de co-culture cellules végétales et agrobactéries.



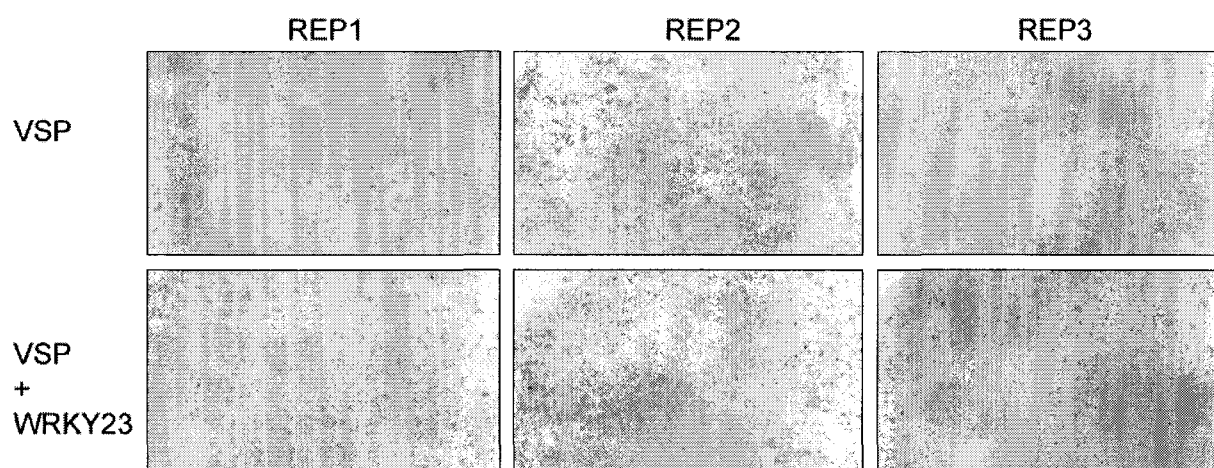
DO = 0,3  
6 jours d'incubation



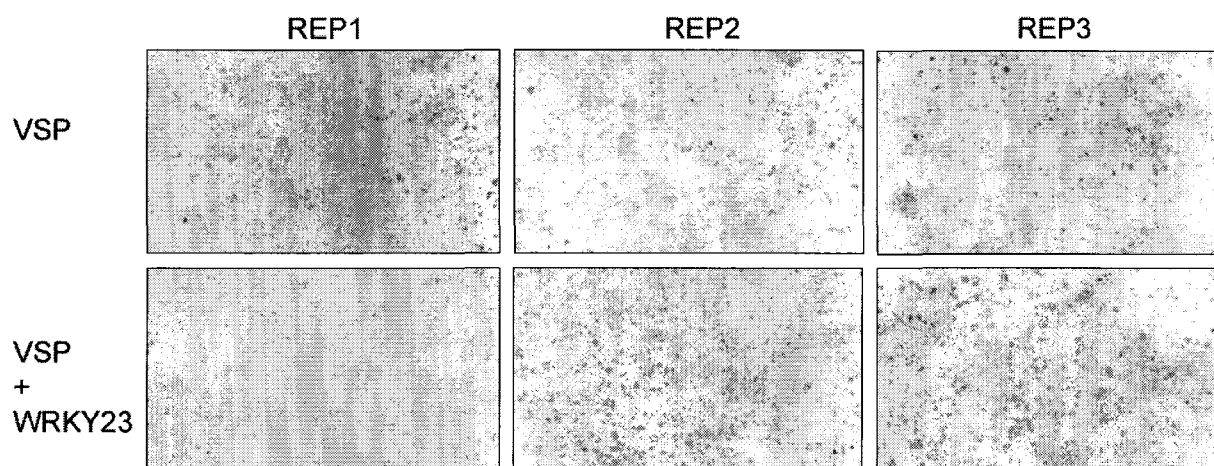
DO = 0,6  
6 jours d'incubation

**Figure 13. Cellules de peuplier infectées par l'*Agrobacterium* contenant un vecteur *hevein::GUS* et un autre contenant le gène *WRKY23* ou un vecteur vide.**

Les DO réfèrent à la quantité totale de bactéries dans un échantillon. Chaque expérience a été faite en triplicata (indiqué par REP1, 2, 3). La révélation dans la solution de x-glucuronide a eu lieu après 6 jours de co-culture cellules végétales et agrobactéries.



DO = 0,3  
6 jours d'incubation



DO = 0,6  
6 jours d'incubation

**Figure 14. Cellules de peuplier infectées par l'*Agrobacterium* contenant un vecteur VSP::*GUS* et un autre contenant le gène *WRKY23* ou un vecteur vide.**

Les DO réfèrent à la quantité totale de bactéries dans un échantillon. Chaque expérience a été faite en triplicata (indiqué par REP1, 2, 3). La révélation dans la solution de x-glucuronide a eu lieu après 6 jours de co-culture cellules végétales et agrobactéries.

## CHAPITRE 3

### DISCUSSION

#### 3.1 LES GÈNES RÉGULÉS PAR PTWRKY23 N'ONT PAS NÉCESSAIREMENT DANS LEURS SÉQUENCES PROMOTRICES UN NOMBRE ÉLEVÉ DE BOÎTES W

Les calculs de moyennes du nombre de boîtes W dans les séquences promotrices des gènes dérégulés par PtWRKY23 chez le peuplier ont révélé qu'il n'y avait pas plus de boîtes W dans ces séquences que dans celles de gènes non régulés par PtWRKY23, alors que différentes équipes ont démontré que les gènes inductibles à la blessure ou impliqués dans la défense ont un plus grand nombre de boîtes W dans leurs promoteurs (Lawrence *et al.*, 2006; Maleck *et al.*, 2000). Une explication plausible serait que le contrôle exercé par *PtWRKY23* sur les gènes qu'il régule peut être indirect: PtWRKY23 activerait ou réprimerait un gène intermédiaire qui lui viendrait agir sur un autre gène, ce dernier n'ayant alors pas nécessairement de boîte W dans son promoteur. Si PtWRKY23, pour accomplir son rôle, avait besoin de cofacteurs, ou d'un transporteur nucléaire, ou encore avait besoin d'être phosphorylé, l'effet de PtWRKY23 dans les 717 transgéniques serait donc secondaire.

#### 3.2 IMPACT DE LA STRUCTURE DU PROMOTEUR PAR RAPPORT AU NOMBRE ABSOLU DE BOÎTES W

L'emplacement des boîtes W sur le promoteur pourrait avoir une importance qu'il est impossible de vérifier par calculs de moyennes. Est-ce qu'une boîte W située plus près du

codon d'initiation a une plus grande importance que celle située à des centaines de paires de bases de l'ATG? À notre connaissance, aucune équipe de recherche n'a pu répondre à cette question jusqu'à maintenant. La structure du promoteur pourrait être plus intéressante que son nombre de boîtes W. Dans certains promoteurs, on retrouve des amas de boîtes W, ce qui pourrait être un moyen d'attirer les facteurs de transcription WRKY à soi. Il a été rapporté qu'un agencement palindromique de deux boîtes W viendrait augmenter significativement le niveau d'expression du gène régulé, comparativement à un promoteur ne contenant qu'une seule boîte W (Laquitaine et al., 2006). Des découvertes récentes mettent en lumière l'importance de la composition de l'environnement immédiat des boîtes W, à savoir que les séquences d'ADN avoisinantes des boîtes W influencent la capacité du facteur WRKY à s'y lier (Ciolkowski *et al.*, 2008). De plus, certains WRKY auraient une nette préférence pour l'une des boîtes W, soit TTGACC ou TTGACT; les deux motifs ne seraient pas identiques dans leur fonction (Ciolkowski *et al.*, 2008). On sait maintenant que certains nucléotides sont prédominants à d'autres de chaque côté de la boîte W, mais d'autres études doivent être faites pour déterminer s'il n'y aurait pas un motif plus précis. Les séquences promotrices des gènes d'entretien peuvent également contenir des boîtes W, alors les boîtes W ne seraient pas l'apanage décrit des séquences reliées à la défense. Il devient nécessaire de distinguer les boîtes W fonctionnelles de la fréquence de retrouver le motif TTGACY au hasard dans le génome. Dans cette étude, les moyennes du nombre de boîtes W par promoteur ne permettent pas d'en soutirer de conclusions générales.

### **3.3 ANALYSE *IN SILICO* ET AGRO-INFECTION TRANSITOIRE: DES OUTILS EFFICACES POUR L'ÉTUDE DE PROMOTEURS**

Les emplacements des boîtes W des séquences étudiées chez le peuplier ont été comparés avec les séquences promotrices des orthologues putatifs d'*Arabidopsis*. Les boîtes W sont rarement situées aux mêmes emplacements entre deux orthologues. Il semblerait donc que l'emplacement des boîtes W ne soit pas conservé au cours de l'évolution des espèces. Il est

tendant de supposer qu'alors l'emplacement serait peu important pour la régulation, en autant qu'il y ait une ou des boîtes W fonctionnelles disponibles.

L'infection de cellules de peuplier avec des cassettes *promoteur::GUS* confirme que les promoteurs régulent l'accumulation de transcrits des gènes candidats et qu'ils ont des forces différentes, y compris pour des promoteurs de gènes d'une même famille. Ici, le contexte de l'expérimentation n'en semble pas un de stress, du moins pour la plupart des gènes étudiés. L'ajout d'*Agrobacterium* dans le milieu modifie significativement les taux de transcrits des gènes *VSP*, *TI4* et *hevein*; pour les autres gènes étudiés, la variation des taux de transcription est inférieure à 2.

Les analyses *promoteur::GUS* ne tiennent pas compte de la stabilité des transcrits; il est difficile de trouver un lien clair entre le nombre de transcrits observé (figure 9) à un jour donné et l'intensité de la coloration bleue des cellules (figure 8) infectées pour un même gène. Une analyse des HGC démontre cependant qu'une forte accumulation de transcrits pour *EIF4* se traduit aussi par une activité GUS relativement forte. La situation avec *CDC2* est très différente avec moins d'accumulation de transcrits et peu de coloration GUS. Il faut aussi considérer que nous avons affaire à deux systèmes différents: le RTqPCR donne le nombre de transcrits à un moment donné alors que la coloration GUS tient compte de tous les transcrits qui ont été traduits en protéines de glucuronidase à partir du moment où la cellule a été infectée, c'est donc l'accumulation graduelle de protéines après l'agroinfection, d'autant plus que la glucuronidase est une protéine très stable. À titre d'exemple, les niveaux d'accumulation de transcrits pour *ZFP1* et *ZFP10* sont relativement faibles et il en est de même pour la coloration GUS. Cependant, la forte coloration GUS avec le promoteur de *CHS6* ne correspond pas avec l'accumulation de transcrits observée par RTqPCR. La stabilité des transcrits pour les gènes candidats testés peut être fortement influencée par les conditions expérimentales et ceci n'entre pas en cause pour les analyses promoteur-GUS.

L'intensité de la coloration bleue des cellules infectées (figure 8) n'a pas de lien direct avec le nombre de boîtes W (figure 7). Sur 2 000 paires de bases, les séquences promotrices étudiées ici ont entre 2 et 7 boîtes W, et celles qui ont un plus grand nombre de boîtes ne sont pas nécessairement celles qui obtiennent les colorations les plus foncées. Comme ce système n'est pas nécessairement en contexte de stress, le nombre de boîtes W peut n'avoir qu'un faible impact sur la force des promoteurs dans ce système. Également, comme il est possible que la réponse de stress ne soit pas visible sur cette échelle de temps (certains gènes choisis sont des gènes de réponse précoce de défense), il est probable que ce système ne puisse pas fournir de conclusion quant à un possible lien entre le nombre de boîtes W d'un promoteur et l'intensité de la coloration des cellules infectées par ce promoteur.

### **3.4 EST-CE QUE PTWRKY23 POURRAIT AVOIR BESOIN DE PARTENAIRES POUR REMPLIR SON RÔLE?**

Les essais de co-transformation transitoire ont permis de déceler une séquence promotrice qui est une cible potentielle de PtWRKY23. L'attachement de PtWRKY23 sur celle-ci peut être direct ou indirect. Dans ce système, les potentiels collaborateurs de PtWRKY23 ne sont pas surexprimés en même temps que lui, les transcrits des partenaires proviennent uniquement des endogènes. Comme les résultats de RTqPCR le démontrent, l'agro-infection ne semble pas déclencher toutes les voies de réactions de défense, puisque plusieurs des gènes de défense testés ne sont pas surexprimés. Si, pour être actif, PtWRKY23 a besoin d'être d'abord phosphorylé, il ne pourra accomplir son rôle dans ce système. Plusieurs WRKY travaillent en réseau, l'exemple le plus flagrant est probablement celui des fonctions parfois redondantes et parfois complémentaires des facteurs *AtWRKY18*, *AtWRKY40* et *AtWRKY60* (Xu *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007). Il est possible que ce soit également le cas pour PtWRKY23: en surexprimant un seul facteur WRKY, les autres facteurs ne sont pas déjà présents en quantité suffisante pour engendrer un effet dans ce système.

## CONCLUSION

Divers mécanismes sont impliqués dans la réponse de défense des végétaux. Ce travail s'attarde sur les cibles potentielles du facteur de transcription WRKY23 du peuplier. Il a été démontré *in silico* que les séquences promotrices des gènes dérégulés dans des plants de peuplier surexprimant *PtWRKY23* ne possèdent pas plus de boîtes W que des séquences promotrices d'un ensemble de gènes sur lequel la surexpression de *PtWRKY23* semble n'avoir aucun effet. Pour ces mêmes gènes dérégulés, l'emplacement des boîtes W n'est pas conservé entre le peuplier et l'*Arabidopsis*. Lors de ce projet, un système de transformation transitoire de cellules en suspension a été mis au point. L'infection avec des cassettes *promoteur::GUS* permet de constater que ces promoteurs ont des forces différentes, y compris pour ceux provenant de gènes de la même famille. En utilisant le même système mais en cotransformant avec une deuxième bactérie contenant le gène *PtWRKY23* en aval du promoteur *UBI*, il est possible d'identifier des cibles de ce facteur de transcription. *PtWRKY23* pourrait se lier directement aux séquences promotrices et enclencher, augmenter ou inhiber la transcription de *GUS*. Il se peut également que *PtWRKY23* ait un effet indirect, c'est-à-dire qu'il ait une action sur un collaborateur qui lui viendrait influencer le taux de transcription. L'adaptation aux cellules 717 du système de cotransformation transitoire apporte un aspect innovant à ces travaux. Il facilite la découverte d'interactions entre facteurs de transcription et promoteurs. Dix séquences promotrices de gènes potentiellement sous la gouverne de *PtWRKY23* ont été testées, en plus de deux séquences dont les gènes ne sont pas régulés par ce facteur de transcription. Il a été observé que l'activité de la séquence promotrice de *CHS3* est diminuée en présence d'une surexpression de *PtWRKY23*, l'identifiant dès lors comme une cible probable de *PtWRKY23*. L'absence de lien direct entre le nombre de boîtes W et la régulation par *PtWRKY23* ainsi que la difficulté à trouver des cibles potentielles en ne surexprimant que ce facteur de transcription permettent de suggérer que *PtWRKY23* requiert un collaborateur pour remplir pleinement son rôle, collaborateur qu'il sera essentiel d'identifier et de



caractériser afin de mieux comprendre la fonction de PtWRKY23. Il serait aussi primordial de vérifier si PtWRKY23 se lie de manière directe ou indirecte au promoteur de *CHS3*. L'emploi de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine sur micropuces d'ADN serait tout approprié pour parvenir à cette fin. Ensuite, une caractérisation de *CHS3* s'avèrera nécessaire. Bien que la souche P19 (Voinnet *et al.*, 2003) produise un suppresseur de l'ARN d'interférence ciblant entre autres notre gène rapporteur, donc supposée favoriser la transcription de ce dernier, les résultats (non montrés) de tests préliminaires ont plutôt indiqué une baisse de la transcription du rapporteur. La souche P19 a donc été rejetée. Il est probable qu'ajouter une souche bactérienne de plus viendrait augmenter la compétition au moment de l'infection avec les bactéries contenant le gène rapporteur.

Dans une perspective plus globale, la mise au point d'une technique de transformation transitoire de cellules 717 permettra de tester facilement différentes combinaisons de séquences promotrices et de facteurs de transcription, afin d'identifier des interactions potentielles. La poursuite de la caractérisation de PtWRKY23, par exemple en explorant ses modes de régulation, serait fort intéressante. Comme certains WRKY ont des fonctions antagonistes ou redondantes d'autres WRKY, il serait pertinent de déterminer si des facteurs agissent de telle sorte par rapport à PtWRKY23. La compréhension du ou des rôles joués par PtWRKY23 nous permettra de définir davantage l'implication et les différentes synergies de la famille des WRKY au sein des mécanismes de défense des végétaux. Ces données pourraient s'avérer importantes d'un point de vue environnemental, par exemple pour sélectionner les cultivars produisant les ratios d'expression des WRKY les plus prompts à activer une défense optimale face aux attaques d'agents pathogènes émergents. Dans les plantations, il est tout dans notre intérêt que les espèces pérennes, tels que les peupliers, aient le bagage génétique nécessaire pour se défendre. Les travaux présentés ici ont permis de faire un petit pas supplémentaire vers l'élucidation des mécanismes de défense des végétaux.

## BIBLIOGRAPHIE

Andrews, L.B., et Curtis, W.R. (2005). Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture. *Biotechnol Prog* 21, 946-952.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., et Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415, 977-983.

Ausubel, F.M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* 6, 973-979.

Azaiez, A., Boyle, B., Levée, V., et Séguin, A. (2009). Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora* rust fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 190-200.

Bari, R., et Jones, J.D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69, 473-488.

Berger, B., Stracke, R., Yatusovich, R., Weisshaar, B., Flugge, U.I., et Gigolashvili, T. (2007). A simplified method for the analysis of transcription factor-promoter interactions that allows high-throughput data generation. *Plant J* 50, 911-916.

Berger, S., Mitchell-Olds, T., et Stotz, H.U. (2002). Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 114, 85-91.

Berthelot, A., et Chantre, G. (2004). La peupleraie française: un maillon essentiel de la filière bois. *Biofutur* 247, 20-23.

Boller, T., et Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60, 379-406.

Buchanan, B.B., Gruissem, W., et Jones, R.L. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Rockville: American Society of plant physiologists).

Chabaud, M., de Carvalho-Niebel, F., et Barker, D.G. (2003). Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep* 22, 46-51.

- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., et Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803-814.
- Ciolkowski, I., Wanke, D., Birkenbihl, R.P., et Somssich, I.E. (2008). Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol Biol* 68, 81-92.
- Citovsky, V., Kozlovsky, S.V., Lacroix, B., Zaltsman, A., Dafny-Yelin, M., Vyas, S., Tovkach, A., et Tzfira, T. (2007). Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cell Microbiol* 9, 9-20.
- Collens, J.I., Mason, H.S., et Curtis, W.R. (2007). *Agrobacterium*-mediated viral vector-amplified transient gene expression in *Nicotiana glutinosa* plant tissue culture. *Biotechnol Prog* 23, 570-576.
- Constabel, C.P., Yip, L., Patton, J.J., et Christopher, M.E. (2000). Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* 124, 285-295.
- Cormack, R.S., Eulgem, T., Rushton, P.J., Kochner, P., Hahlbrock, K., et Somssich, I.E. (2002). Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochim Biophys Acta* 1576, 92-100.
- Cseke, L.J., Cseke, S.B., et Podila, G.K. (2007). High efficiency poplar transformation. *Plant Cell Rep* 26, 1529-1538.
- de Pinto, M.C., Paradiso, A., Leonetti, P., et De Gara, L. (2006). Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *Plant J* 48, 784-795.
- de Wit, P.J. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* 64, 2726-2732.
- de Wit, P.J., Mehrabi, R., Van den Burg, H.A., et Stergiopoulos, I. (2009). Fungal effector proteins: past, present and future. *Mol Plant Pathol* 10, 735-747.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., et Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 13454-13459.
- Ditt, R.F., Nester, E.W., et Comai, L. (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10954-10959.

- Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I., et Hirt, H. (2007). Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* 318, 453-456.
- Dong, J., Chen, C., et Chen, Z. (2003). Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* 51, 21-37.
- Droillard, M., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., et Lauriere, C. (2002). Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett* 527, 43-50.
- Du, L., et Chen, Z. (2000). Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in Arabidopsis. *Plant J* 24, 837-847.
- Eulgem, T. (2005). Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends Plant Sci* 10, 71-78.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., et Somssich, I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5, 199-206.
- Eyles, A., Bonello, P., Ganley, R., et Mohammed, C. (2010). Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytol* 185, 893-908.
- Frey, P., et Pinon, J. (2004). La rouille du peuplier: un pathosystème modèle. *Biofutur* 247, 28-32.
- Gagné, P. (2005). Maladies et ravageurs des arbres à croissance rapide au Québec. *Revue de littérature. Réseau Ligniculture Québec*.
- Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 16-37.
- Grant, M., et Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol* 9, 414-420.
- Grant, M.R., et Jones, J.D. (2009). Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 324, 750-752.
- Grunewald, W., Karimi, M., Wieczorek, K., Van de Cappelle, E., Wischnitzki, E., Grundler, F., Inze, D., Beeckman, T., et Gheysen, G. (2008). A role for AtWRKY23 in feeding site establishment of plant-parasitic nematodes. *Plant Physiol* 148, 358-368.
- Hamel, L.P., Miles, G.P., Samuel, M.A., Ellis, B.E., Séguin, A., et Beaudoin, N. (2005). Activation of stress-responsive mitogen-activated protein kinase pathways in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*). *Tree Physiol* 25, 277-288.

- He, P., Shan, L., et Sheen, J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell Microbiol* 9, 1385-1396.
- Heil, M., et Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends Plant Sci* 13, 264-272.
- Hellens, R.P., Allan, A.C., Friel, E.N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M.D., Karunairetnam, S., Gleave, A.P., et Laing, W.A. (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* 1, 13.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., et Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* 27, 297-300.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., et Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnol* 11, 1026-1030.
- Jansson, S., et Douglas, C.J. (2007). *Populus*: a model system for plant biology. *Annu Rev Plant Biol* 58, 435-458.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., et Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6, 3901-3907.
- Jones, J.D., et Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Kim, C.Y., et Zhang, S. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J* 38, 142-151.
- Lacroix, B., Tzfira, T., Vainstein, A., et Citovsky, V. (2006). A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends Genet* 22, 29-37.
- Laquitaine, L., Gomes, E., Francois, J., Marchive, C., Pascal, S., Hamdi, S., Atanassova, R., Delrot, S., et Coutos-Thevenot, P. (2006). Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against botrytis cinerea: induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 1103-1112.
- Lawrence, S.D., Dervinis, C., Novak, N., et Davis, J.M. (2006). Wound and insect herbivory responsive genes in poplar. *Biotechnol Lett* 28, 1493-1501.
- Levéé, V., Major, I., Levasseur, C., Tremblay, L., MacKay, J., et Séguin, A. (2009). Expression profiling and functional analysis of *Populus* WRKY23 reveals a regulatory role in defense. *New Phytol* 184, 48-70.

- Li, J., Brader, G., Kariola, T., et Palva, E.T. (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* 46, 477-491.
- Li, J., Brader, G., et Palva, E.T. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16, 319-331.
- Liu, Y., Ahn, J.E., Datta, S., Salzman, R.A., Moon, J., Huyghues-Despointes, B., Pittendrigh, B., Murdock, L.L., Koiwa, H., et Zhu-Salzman, K. (2005). Arabidopsis vegetative storage protein is an anti-insect acid phosphatase. *Plant Physiol* 139, 1545-1556.
- Livak, K.J., et Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta C(T))$  Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., et Darnell, J. (1997). *Biologie moléculaire de la cellule* (Paris: De Boeck Université).
- Ma, S., et Bohnert, H.J. (2007). Integration of Arabidopsis thaliana stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biol* 8, R49.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangel, J.L., and Dietrich, R.A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* 26, 403-410.
- McCullen, C.A., et Binns, A.N. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 101-127.
- Menke, F.L., Kang, H.G., Chen, Z., Park, J.M., Kumar, D., et Klessig, D.F. (2005). Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol Plant-Microbe Interact* 18, 1027-1034.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., et Shinozaki, K. (1996). A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93, 765-769.
- Nicole, M.C., Hamel, L.P., Morency, M.J., Beaudoin, N., Ellis, B.E., et Séguin, A. (2006). MAP-ping genomic organization and organ-specific expression profiles of poplar MAP kinases and MAP kinase kinases. *BMC Genomics* 7, 223.
- Odintsova, T.I., Vassilevski, A.A., Slavokhotova, A.A., Musolyamov, A.K., Finkina, E.I., Khadeeva, N.V., Rogozhin, E.A., Korostyleva, T.V., Pukhalsky, V.A., Grishin, E.V., et

- Egorov, T.A. (2009). A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif. *FEBS J* 276, 4266-4275.
- Pandey, S.P., et Somssich, I.E. (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol* 150, 1648-1655.
- Philippe, R.N., et Bohlmann, J. (2007). Poplar defense against insect herbivores. *Can J Bot* 85, 1111-1126.
- Pinto, M.S., Siqueira, F.P., Oliveira, A.E., et Fernandes, K.V. (2008). A wounding-induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Phytochemistry* 69, 2297-2302.
- Poland, J.A., Balint-Kurti, P.J., Wisser, R.J., Pratt, R.C., et Nelson, R.J. (2009). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci* 14, 21-29.
- Prestridge, D.S. (1991). SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Comput Appl Biosci* 7, 203-206.
- Pruss, G.J., Nester, E.W., et Vance, V. (2008). Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* induces host defense and development-dependent responses in the infiltrated zone. *Mol Plant-Microbe Interact* 21, 1528-1538.
- Qiu, D., Xiao, J., Xie, W., Cheng, H., Li, X., et Wang, S. (2009). Exploring transcriptional signalling mediated by OsWRKY13, a potential regulator of multiple physiological processes in rice. *BMC Plant Biol* 9, 74.
- Ren, C.M., Zhu, Q., Gao, B.D., Ke, S.Y., Yu, W.C., Xie, D.X., et Peng, W. (2008). Transcription factor WRKY70 displays important but no indispensable roles in jasmonate and salicylic acid signaling. *J Integr Plant Biol* 50, 630-637.
- Rutledge, R.G., et Stewart, D. (2008). A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol* 8, 47.
- Santos-Rosa, M., Poutaraud, A., Merdinoglu, D., et Mestre, P. (2008). Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration. *Plant Cell Reports* 27, 1053-1063.
- Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr Opin Plant Biol* 12, 459-464.
- Shen, Q.H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, I.E., et Schulze-Lefert, P. (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315, 1098-1103.

Tian, W.M., Peng, S.Q., Wang, X.C., Shi, M.J., Chen, Y.Y., et Hu, Z.H. (2007). Vegetative storage protein in *Litchi chinensis*, a subtropical evergreen fruit tree, possesses trypsin inhibitor activity. *Ann Bot* 100, 1199-1208.

Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., *et al.* (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313, 1596-1604.

Ulker, B., Shahid Mukhtar, M., et Somssich, I.E. (2007). The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways. *Planta* 226, 125-137.

Ulker, B., et Somssich, I.E. (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol* 7, 491-498.

van Loon, L.C., Geraats, B.P., et Linthorst, H.J. (2006a). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 11, 184-191.

van Loon, L.C., Rep, M., et Pieterse, C.M. (2006b). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44, 135-162.

van Verk, M.C., Pappaioannou, D., Neeleman, L., Bol, J.F., et Linthorst, H.J. (2008). A Novel WRKY transcription factor is required for induction of *PR-1a* gene expression by salicylic acid and bacterial elicitors. *Plant Physiol* 146, 1983-1995.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., et Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, research0034.1–research0034.11.

VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., et Farmer, E.E. (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant Cell* 6, 1191-1192.

Vigneault F., Lachance D., Cloutier M., Pelletier G., Levasseur C. et Séguin A. (2007). Members of the plant NIMA-related kinases are involved in organ development and vascularization in poplar, *Arabidopsis* and rice. *Plant J* 51: 575-588.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., et Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949-956.

Wan, J., Zhang, S., et Stacey, G. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin. *Mol Plant Pathol* 5, 125-135.



Wang, D., Amornsiripanitch, N., et Dong, X. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog* 2, e123.

Xu, X., Chen, C., Fan, B., et Chen, Z. (2006). Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* 18, 1310-1326.

Yoshioka, Y., Takahashi, Y., Matsuoka, K., Nakamura, K., Koizumi, J., Kojima, M., et Machida, Y. (1996). Transient gene expression in plant cells mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: application for the analysis of virulence loci. *Plant Cell Physiol* 37, 782-789.

Zhang, Z.L., Shin, M., Zou, X., Huang, J., Ho, T.H., et Shen, Q.J. (2009). A negative regulator encoded by a rice WRKY gene represses both abscisic acid and gibberellins signaling in aleurone cells. *Plant Mol Biol* 70, 139-151.